



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PRODUKCE, CHARAKTERIZACE A APLIKACE POLYMERŮ
Kyseliny jablečné a glutamové**

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF POLYMERS OF MALIC AND GLUTAMIC ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Katarína Čangelová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1133/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Katarína Čangelová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Produkce, charakterizace a aplikace polymerů kyseliny jablečné a glutamové

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Výběr vhodných mikrobiálních kultur
3. Studium produkce vybraných biopolymerů
4. Charakterizace připravených biopolymerů

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Katarína Čangelová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predmetom tejto bakalárskej práce bolo štúdium produkcie biopolymérov pomocou mikroorganizmov. Polymér kyseliny jablčnej bol produkovaný kvasinkoidnou hubou *Aureobasidium pullulans* a na biosyntézu polyméru kyseliny glutámovej bola použitá baktéria *Bacillus licheniformis*. V teoretickej časti práce sa nachádza charakteristika jednotlivých polymérov, ich mikrobiálnych producentov a možná aplikácia v rôznych oblastiach. Prostredníctvom experimentov bol sledovaný vplyv rozličných podmienok na bunkový rast a produkciu týchto polymérov. Boli optimalizované podmienky kultivácie z hľadiska produkcie polymérov a následne využité odpadové substráty – srvátka a hydínové perie. Mikrobiálne produkovaný polymér kyseliny jablčnej bol hydrolyzovaný s 2 M kyselinou sírovou a koncentrácia jablčnej kyseliny bola analyzovaná IEC s vodivostným detektorom. Koncentrácia polyméru kyseliny glutámovej bola určená spektrofotometrickou metódou s využitím CTAB.

ABSTRACT

Subject of this bachelor thesis was study of biopolymers production using microorganisms. Polymer of malic acid was produced by *Aureobasidium pullulans*, a yeast-like fungus. Biosynthesis of polymer of glutamic acid was carried out by *Bacillus licheniformis* bacterium. Particular polymers, their microbial producers and possible application in different areas are characterised in the theoretical part of the thesis. Through experiments, the effect of various conditions on cell growth and production of these polymers was studied. Cultivation conditions were optimised in terms of polymers production. Subsequently, waste substrates - whey and poultry feathers were used. Microbially-produced polymer of malic acid was hydrolysed with 2 M sulfuric acid. Concentration of malic acid was analysed by IEC with a conductivity detector. Concentration of polymer of glutamic acid was determined by a spectrophotometric method using CTAB.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

polymér kyseliny jablčnej, PMA, *Aureobasidium pullulans*, polymér kyseliny glutámovej, PGA, *Bacillus licheniformis*, odpadové substráty, extracelulárne polyméry

KEYWORDS

polymer of malic acid, PMA, *Aureobasidium pullulans*, polymer of glutamic acid, PGA, *Bacillus licheniformis*, waste substrates, extracellular polymers

ČANGELOVÁ, K. Produkce, charakterizace a aplikace polymerů kyseliny jablečné a glutamové. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 59 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcela by som sa poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce, doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D., za odborné vedenie a pomoc pri riešení problémov. Tiež by som sa rada poďakovala Ing. Pavle Benešovej za rady, ochotu a pripomienky, ktoré mi pomohli pri vypracovaní tejto práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Biopolyméry	9
2.1.1	Poly(α -estery)	9
2.1.2	Poly(amino kyseliny) a proteíny	10
2.1.3	Polysacharidy	10
2.2	Odpadové substráty v biotechnologickej konverzii	11
2.2.1	Srvátka	11
2.2.2	Perie	11
2.3	Polymér kyseliny jablčnej	12
2.3.1	Kyselina jablčná	12
2.3.2	Biotechnologická produkcia polyméru kyseliny jablčnej	13
2.3.2.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	13
2.3.2.2	Navrhovaná biosyntetická dráha pre PMA v druhoch <i>Aureobasidium</i>	14
2.3.3	Syntetická produkcia polyméru kyseliny jablčnej	15
2.3.3.1	Ring-opening polymerizácia	15
2.3.3.2	Polykondenzácia	15
2.3.4	Aplikácia polyméru kyseliny jablčnej	16
2.4	Polymér kyseliny glutámovej	17
2.4.1	Glutámová kyselina	18
2.4.1.1	L-glutámová kyselina	18
2.4.1.2	D-glutámová kyselina	18
2.4.2	α -PGA	19
2.4.3	γ -PGA	19
2.4.4	Biotechnologická produkcia polyméru glutámovej kyseliny	20
2.4.4.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	21
2.4.4.2	Mechanizmus biosyntézy	21
2.4.5	Syntetická produkcia polyméru glutámovej kyseliny	23
2.4.6	Aplikácia polyméru glutámovej kyseliny	24
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
3.1	Použité mikrobiálne kmene, chemikálie a prístrojové vybavenie	26

3.1.1	Produkčné mikroorganizmy	26
3.1.2	Použité chemikálie, materiál, štandardy	26
3.1.3	Prístroje a pomôcky	27
3.2	Hydrolýza odpadových substrátov.....	28
3.2.1	Enzymatická hydrolýza srvátky	28
3.2.2	Chemická hydrolýza peria	28
3.3	Kultivácia kmeňov <i>Aureobasidium pullulans</i>	28
3.3.1	Tuhé uchovávacie médium	28
3.3.2	Príprava inokula.....	28
3.3.3	Príprava produkčného média	29
3.3.4	Štúdium efektov počiatočnej koncentrácie glukózy na produkciu PMA.....	30
3.3.5	Štúdium efektu rôznych suplementov na bunkový rast a produkciu PMA.....	30
3.3.6	Použitie srvátky a peria – odpadových substrátov v produkcii PMA	31
3.3.7	Analýza biomasy	31
3.3.8	Stanovenie koncentrácie extracelulárnych produktov gravimetricky	32
3.3.9	Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny	32
3.3.9.1	Príprava roztokov a vzoriek	32
3.3.9.2	Príprava kalibračnej krivky.....	33
3.3.10	Určenie koncentrácie PMA iónovo výmennou chromatografiou IEC.....	33
3.3.10.1	Príprava hydrolyzovaných vzoriek	33
3.4	Kultivácia mikroorganizmu <i>Bacillus licheniformis</i>	33
3.4.1	Tuhé uchovávacie médium	33
3.4.2	Príprava inokula.....	34
3.4.3	Príprava produkčného média	34
3.4.4	Štúdium vplyvu pH na biosyntézu PGA.....	35
3.4.5	Použitie odpadových substrátov v produkcii PGA	35
3.4.6	Analýza biomasy	35
3.4.7	Stanovenie koncentrácie PGA gravimetricky	36
3.4.8	Stanovenie koncentrácie PGA spektrofotometricky	36
3.4.8.1	Príprava roztokov a vzoriek	36
3.4.8.2	Príprava kalibračnej krivky.....	36
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	38
4.1	Kalibrácia metód.....	38
4.1.1	Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny	38

4.1.2	Určenie koncentrácie PMA iónovo výmennou chromatografiou IEC	38
4.1.3	Stanovenie koncentrácie PGA spektrofotometricky	39
4.2	Kultivácia kmeňov <i>Aureobasidium pullulans</i>	40
4.2.1	Štúdium efektov počiatočnej koncentrácie glukózy na produkciu PMA.....	40
4.2.2	Štúdium efektu rôznych suplementov na bunkový rast a produkciu PMA.....	43
4.2.3	Použitie srvátky a peria – odpadových substrátov v produkcii PMA	45
4.3	Kultivácia mikroorganizmu <i>Bacillus licheniformis</i>	48
4.3.1	Štúdium vplyvu pH na biosyntézu PGA.....	48
4.3.2	Použitie odpadových substrátov v produkcii PGA	49
5	ZÁVER	51
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	53
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	59

1 ÚVOD

Polymér kyseliny jablčnej je vo vode rozpustný polyester s biologickou rozložiteľnosťou a biokompatibilitou. Tento polymér je využívaný v biomedicínskych aplikáciach ako nosič liečiv. Z jeho vo vode nerozpustných derivátov sú vyrábané pevné nanočastice a filmy. Na biotechnologickú produkciu tohto polyméru sú používané mikroorganizmy ako *Physarum polycephalum* a tiež *Aureobasidium pullulans*, pri ktorom boli reportované vyššie výťažky polyméru kyseliny jablčnej. *Aureobasidium pullulans* je kozmopolitná kvasinkoidná huba, môže produkovať rôzne bioprodukty, vrátane polysacharidu pullulanu, polyméru kyseliny jablčnej a extracelulárnych enzýmov.

Polymér kyseliny glutámovej je polyamid pozostávajúci z monomérov D- a L-glutámovej kyseliny. Tieto monoméry sú spojené amidovými väzbami medzi α -amino a γ -karboxylovými skupinami. Vďaka svojim vlastnostiam, medzi ktoré patrí rozpustnosť vo vode, biodegradabilita a netoxičita, má početné potenciálne aplikácie v medicíne, kozmetike, potravinárskom priemysle a environmentálnej oblasti. Polymér kyseliny glutámovej je extracelulárny produkt niekoľkých druhov *Bacillus*, hlavne *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*. V tejto práci využívaný *Bacillus licheniformis* je gram-pozitívna, fakultatívne anaeróbna, sporulujúca baktéria. Už niekoľko desaťročí sa mimo produkcie polyméru kyseliny glutámovej používa pri výrobe priemyselných enzýmov a peptidových antibiotík.

V poslednej dobe sa pozornosť vedeckej obce upriamuje na využitie odpadových substrátov, ktorých narastajúce množstvo čoraz viac zaťažuje životné prostredie. Na biosyntézu polymérov kyseliny jablčnej a glutámovej je možné ako zdroj uhlíka a dusíka použiť srvátku a perie. Tieto alternatívne materiály sú navyše ekonomicky výhodnejšie z dôvodu zníženia nákladov na produkciu.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Biopolyméry

Termín biopolymér je všeobecne chápaný ako organický polymér, ktorý je produkovaný živými organizmami v prírode. Jednou z hlavných výhod biopolymérov je, že sú plne schopné biodegradácie. Rozklad prebieha na jednoduché molekuly, ktoré možno nájsť v životnom prostredí, ako je napríklad oxid uhličitý, voda alebo metán. Podľa metód produkcie alebo ich zdrojov sú klasifikované na:

- Polyméry priamo extrahované alebo odstránené z biomasy, ako sú polysacharidy a proteíny,
- Polyméry produkované klasickou chemickou syntézou z obnoviteľných bio-monomérov, ako napríklad kyselina polymliečna,
- Polyméry produkované mikroorganizmami alebo geneticky modifikovanými baktériami, ako polyhydroxyalkanoáty či bakteriálna celulóza [1].

2.1.1 Poly(α -estery)

Poly(α -estery) sú termoplastické polyméry s hydrolyticky labilnými alifatickými esterovými väzbami na hlavnom reťazci. Hoci všetky polyestery sú teoreticky degradabilné – esterifikácia je chemicky reverzibilný proces, ale len alifatické polyestery s krátkymi alifatickými reťazcami medzi esterovými väzbami môžu degradovať. Poly(α -estery) zahŕňajú najskoršiu a najviac preskúmanú triedu biodegradabilných polymérov. Jedinečnosť tejto triedy polymérov spočíva v jej nesmiernej rozmanitosti a syntetickej univerzálnosti. Je známych niekoľko alifatických polyesterov, ktoré slúžia ako biologicky rozložiteľné materiály, majú dobrú biokompatibilitu a ovládateľné degradačné profily. Trieda poly(α -esterov) zahŕňa poly(α -hydroxykyseliny) a ďalšie esterové polyméry s a bez kyslíkového atómu susediaceho s α -uhlíkom v kyselinovej časti. Poly(α -estery) môžu byť vytvorené z rôznych monomérov cez ring-opening polymerizáciu a kondenzačnú polymerizáciu v závislosti od monomérnych jednotiek. Syntéza polykondenzáciou môže byť z difunkčných monomérov, ako napríklad vlastná kondenzácia hydroxykyselín, dikyselín s diolmi, chloridov dikyselín s diolmi alebo reesterifikačnou reakciou diesterov a diolov. Avšak je ťažké dosiahnuť vysokú molekulovú hmotnosť polymérov polykondenzačným spôsobom, preto sa viac používa ROP cyklických laktónov, ktorej výhodou sú miernejšie

reakčné podmienky, kratšie reakčné časy a absencia reakcie vedľajších produktov. Bakteriálne bioprocenové metódy môžu byť taktiež použité na vytvorenie poly(α -esterov) – prirodzene sa vyskytujúcich, biologicky odbúrateľných polymérov produkovaných rôznymi mikroorganizmami [2].

2.1.2 Poly(aminokyseliny) a proteíny

Poly(aminokyseliny) – polyamidy sa líšia od proteínov v rôznych aspektoch. Zatiaľ, čo proteín je zložený z rôznych aminokyselín, poly(aminokyseliny) sú zložené len z jedného druhu aminokyseliny. DNA riadi umiestnenie aminokyselín v určitom poradí za tvorby molekuly proteínu, kým poly(aminokyseliny) sú v mikroorganizmoch biosyntetizované inou cestou. Amidové väzby v proteínoch sú vytvorené iba medzi α -amino a α -karboxylovou skupinou (α -amidové väzby). Poly(aminokyseliny) vykazujú polydisperzitu a okrem α -amidových väzieb majú aj iné typy amidových väzieb – β - a γ -karboxylové skupiny, ako aj ϵ -amino skupiny. Proteíny, hlavné konštrukčné komponenty, sú v podstate aminokyselinové polyméry usporiadané do trojrozmernej štruktúry. Ľudské telo je schopné syntetizovať široký rad proteínov. Prvý krok je tvorba primárnej štruktúry, kde je lineárna sekvencia rôznych aminokyselín držaná pohromade peptidovými väzbami. Primárna štruktúra sa usporiada do α -skrutkovice alebo štruktúry β -skladaný list pomocou vodíkových väzieb za vzniku sekundárnej väzby. Tieto sekundárne väzby sa potom spoja dohromady a vytvoria trojrozmerné terciárne štruktúry, ktoré vzájomne pôsobia s ďalšími proteínovými reťazcami za tvorby presnejšej, trojrozmernej kvartérnej štruktúry multijednotkového proteínu [2; 3].

2.1.3 Polysacharidy

Polysacharidy sú polyméry monosacharidov spojené glykosidovou väzbou. Tvorba polysacharidov je výsledkom medzimolekulárnej dehydratácie medzi kruhovými štruktúrami cukru. Tieto monoméry sú teda cyklické štruktúry, najmä s obsahom 5 alebo 6 atómov uhlíka – pentózy a hexózy. Príkladom pentózy je ribóza, ktorá je jedným zo základných kameňov nukleových kyselín. Mnoho polysacharidov je zložených z hexóz, ako je sacharóza alebo galatóza. Polysacharidy nikdy nie sú tak zložité, ako proteíny a nukleové kyseliny, pretože majú na rozdiel od nich náhodný stupeň polymerizácie a väčšinou neobsahujú dva druhy zvyškov [4].

2.2 Odpadové substráty v biotechnologickej konverzii

Obrovské množstvo poľnohospodárskych a poľnohospodársko-priemyselných zvyškov je generovaných v dôsledku rôznych poľnohospodárskych a priemyselných postupov. Tieto zvyšky predstavujú jeden z najdôležitejších energeticky bohatých zdrojov. Každoročná akumulácia biomasy vo veľkých množstvách má za následok nielen zhoršovanie životného prostredia, ale aj stratu potenciálne cenného materiálu, ktorý môže byť spracovaný na získanie rozličných výrobkov s pridanou hodnotou, ako sú potraviny, palivá, krmivá a rôzne chemické látky. Ako odpadový substrát môže byť použitá napríklad syrová srvátka, citrusové šupky, pšeničné otruby, hovädzia krv, trstinová meláza, kuracie perie, kukuričný lúh [5; 6].

2.2.1 Srvátka

Mliečny priemysel generuje značné množstvo kvapalných odpadov, z ktorých syrová srvátka je najhojnejšia. Je to žltozelená kvapalina, ktorá zostane po precipitácii mlieka počas výroby syru. Syridlá alebo jedlé kyseliny sa pridávajú k zahriatemu mlieku, čo má za následok koaguláciu mlieka a separáciu pevných látok z mlieka od kvapalnej srvátky. Chemické zloženie srvátky sa líši v závislosti od typu použitého mlieka, rozmanitosti vyrábaných syrov a použitého procesu. Zvyčajne je syrová srvátka pomerne zriedený výrobok s celkovým obsahom 5-8 % pevných látok, zahŕňajúcich proteíny (10-20 %), laktózu (60-80 %), tuk (3 %), minerálne látky (8 %), vitamíny, kyselinu mliečnu a stopové prvky. Syrová srvátka je produkovaná vo veľmi vysokom a neustále rastúcom množstve. Svetová produkcia syrovej srvátky sa odhaduje na viac ako 10^8 ton ročne, čo vytvára problémy s likvidáciou a predstavuje dôležitý prídavok do znečistenia životného prostredia. V posledných rokoch rastie informovanosť o ekologických problémoch spôsobenými srvátkou a preto sa kladie značné úsilie využiť syrovú srvátku pre mikrobiálny rast na výrobu zlúčenín s pridanou hodnotou prostredníctvom fermentačných procesov [7].

2.2.2 Perie

Kuracie perie je zložené z viac ako 90 % bielkovín, hlavnou zložkou je keratín – vlákniť a nerozpustný proteín, vysoko zosieťovaný disulfidom a ostatnými väzbami. Keratín z peria vykazuje zvýšený obsah aminoskyselín – glycínu, alanínu, serínu, cysteínu a valínu, ale nižšie množstvo lyzínu, metionínu a tryptofánu. Každoročne sa generuje niekoľko miliónov ton peria v odvetviach spracovania hydiny. V niektorých krajinách sa perie využíva ako

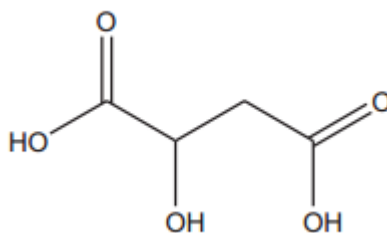
doplnok krmiva pre zvieratá, perie môže tiež nájsť využitie vo fermentačnom priemysle pre výrobu mikrobiálnych keratináz. Avšak nie sú známe žiadne informácie o iných oblastiach využitia kuracieho peria, napriek vysokému obsahu bielkovín a zloženiu aminokyselín. Konverzia kuracieho peria na pepton môže byť jednou z odpovedí k zníženiu celkovej ceny mikrobiálneho kultivačného média, ako aj metóda šetrná k životnému prostrediu pre odstránenie týchto zvyškov [8].

2.3 Polymér kyseliny jablčnej

Polymér kyseliny jablčnej (PMA) je vo vode rozpustný polyester s mnohými atraktívnymi vlastnosťami, vrátane biologickej rozložiteľnosti a biokompatibility, rovnako kvôli jeho univerzálne závesnej karboxylovej skupine, na ktorú je možné zavedenie biologicky aktívnych molekúl. Polymér kyseliny jablčnej a jeho deriváty zvýšili vedeckú a technickú pozornosť v priebehu niekoľkých posledných rokov kvôli veľkému potenciálu v rôznych biomedicínskych aplikáciách. Je ho možné syntetizovať chemickou syntézou alebo biologickou fermentáciou myxomycét a niektorých vláknitých húb. Na rozdiel od chemicky syntetických verzií, PMA biologického pôvodu je zvyčajne enantiomérne čistá [9].

2.3.1 Kyselina jablčná

Kyselina jablčná ($C_4H_6O_5$) je organická kyselina a dôležitý medziprodukt v cykle trikarboxylových kyselín. Vyskytuje sa v relatívne veľkom množstve v rôznych druhoch ovocia a zeleniny. Kyselina jablčná má dve stereoizomerné formy L- a D-enantioméry, pričom len L-jablčná kyselina sa prirodzene vyskytuje v prírode. Má širokú škálu aplikácií v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle. Používa sa tiež na spracovanie kovov. Táto kyselina môže byť pripravená rôznymi spôsobmi, napríklad extrakciou z rastlín, enzymatickou konverziou alebo chemickými syntézami. Tradičný spôsob produkcie – extrakcia z ovocia nemá žiadne praktické využitie vzhľadom k malej kapacite produkcie. Chemicky sa syntetizuje hydratáciou kyseliny maleínovej alebo kyseliny fumarovej. Produkcia tejto kyseliny je možná aj enzymatickou konverziou kyseliny fumarovej s použitím fumarázy [10; 11; 12].



Obrázok 1 Chemická štruktúra kyseliny jablčnej [11]

2.3.2 Biotechnologická produkcia polyméru kyseliny jablčnej

Na bioprodukciiu polyméru kyseliny jablčnej sú používané mikroorganizmy ako *Physarum polycephalum* alebo *Aureobasidium pullulans*. Polymér kyseliny jablčnej z týchto dvoch druhov môže mať rôznu veľkosť (molekulovú hmotnosť), môže sa líšiť biologickými funkciami a tiež jeho biosyntetickým mechanizmom. Pri *Physarum polycephalum* je akumulovaný v jadre, následne je uvoľnený do cytoplazmy a nakoniec do kultivačného média. Predpokladá sa, že môže mať funkciu ako úložisko a nosič molekúl v *Physarum polycephalum*. Avšak kvôli nízkemu výťažku ($2,7 \text{ g.l}^{-1}$) polyjablčnej kyseliny pri *Physarum polycephalum* sa obmedzila jeho aplikácia vo veľkovýrobe polyméru kyseliny jablčnej. *Aureobasidium pullulans* produkuje oveľa väčšie množstvo polyméru kyseliny jablčnej za vhodných podmienok. Rozmanité výťažky tohto polyméru v rôznych kmeňoch sú v rozmedzí $9,8 - 47 \text{ g.l}^{-1}$. Biosyntéza a fyziologické funkcie polyméru kyseliny jablčnej v *Aureobasidium pullulans* však stále nie sú jasné [9].

2.3.2.1 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans je kozmopolitná kvasinkoidná huba známa ako čierna kvasinka, kvôli produkcii melanínu s charakteristickým čiernym sfarbením. Jeho tri charakteristické tvary sú pretiahnuté, rozvetvené a predelené vlákna, veľké chlamydospóry a menšie eliptické kvasinkoidné bunky. Zo začiatku tvorí žlté, krémové, svetloružové alebo svetlohnedé kolónie, ktoré sa v neskoršej fáze stávajú čiernasté kvôli produkcii chlamydospór, čo je charakteristický znak tohoto mikroorganizmu. Z ekologického hľadiska sú kmene *Aureobasidium pullulans* všadeprítomné, nachádzajúce sa hlavne v pôde, vode, dreve, rastlinných materiáloch či skalách. V posledných desaťročiach sa zistilo, že kmene *Aureobasidium pullulans* majú mnoho využití v rôznych oblastiach, kvôli ich produkcii, ktorá zahŕňa prevažne pullulan. Pullulan je lineárny α -D-glukán z opakujúcich sa jednotiek maltotriózy spojených $\alpha(1 \rightarrow 6)$ väzbami. Je to vode rozpustný extracelulárny

homopolysacharid. Pravidelné striedanie α -1,4 a α -1,6 väzieb spôsobuje jeho štruktúrnu flexibilitu a dobrú rozpustnosť. Tento polysacharid má veľký význam v potravinárskom, farmaceutickom, poľnohospodárskom a chemickom priemysle. Pullulan produkuje vysoko viskózne roztoky pri relatívne nízkej koncentrácii a môže byť použitý pre kyslíkom nepriepustné filmy a vlákna, zhusťovacie adhezívne a enkapsulačné činidlá. Napriek tomu, že je to α -D-glukán, je odolný voči pôsobeniu α -D-amylózy a môže byť použitý v nízkokalorických jedlách. *Aureobasidium pullulans* ďalej produkuje extracelulárne enzýmy (proteáza, lipáza, amyláza), jednobunkové proteíny, využívané ako krmivá pre zvieratá a ľudskú potravu, a proteínové zdroje pre výrobu bioaktívnych peptidov. Bolo tiež zistené, že niektoré kmene *Aureobasidium pullulans* je možné použiť na kontrolu rastu nežiadúcich mikroorganizmov [13].

2.3.2.2 Navrhovaná biosyntetická dráha pre PMA v druhoch *Aureobasidium*

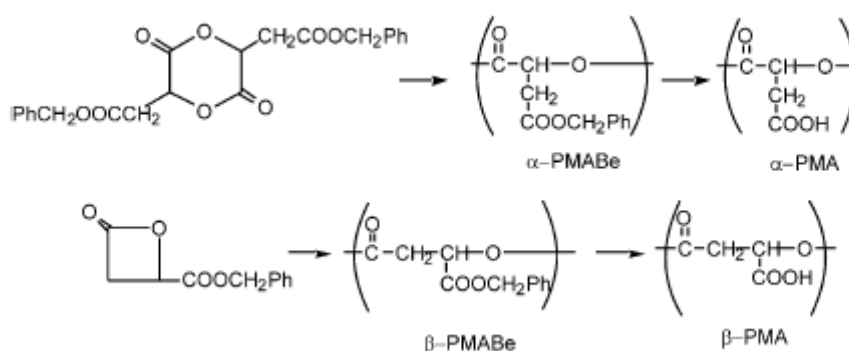
Vzhľadom k tomu, že L-jablčná kyselina je jediný monomér PMA, jeho biosyntéza s ním úzko súvisí. Zatiaľ boli identifikované 3 metabolické dráhy pre produkciu L-jablčnej kyseliny z glukózy, a to oxidačná dráha, neoxidačná dráha a glyoxylátový cyklus. Neoxidačná dráha je preferovaná, keď sa 1 mol glukózy premení na 2 móly L-jablčnej kyseliny. Rovnako ako je navrhnutá biosyntéza PMA v *Physarum polycephalum*, tak aj v druhoch *Aureobasidium*. L-malát využívaný pre PMA produkciu je syntetizovaný cez karboxyláciu pyruvátu a následnou redukciou oxalátu v prítomnosti CaCO_3 v cytosole. Avšak stále nie je známe, ako sa L-jablčná kyselina polymerizuje do PMA. Sú predpokladané dve možnosti. V prvom prípade, vytvorený L-malát môže reagovať s CoA-SH za katalýzy thiokinázy, ako napríklad L-malyl-CoA ligáza za vzniku L-malyl-CoA. Následne sa L-malyl-CoA polymerizuje do PMA pomocou PMA syntetázy. Z tohto dôvodu môže byť pyruvátkarboxyláza, malátdehydrogenáza, thiokináza a PMA syntetáza zúčastnená na biosyntéze PMA. V druhom prípade, syntéza PMA veľmi pravdepodobne zahŕňa enzýmový komplex pozostávajúci z malyl-AMP ligázy a malyl-transferázy (polymerázy) v analógií s NRPS (neribozomálny peptid syntetáza). Tvorba malyl-AMP je reverzibilná reakcia s pyrofosfátom vo forme vedľajšieho produktu. Podľa mechanizmu NRPS, aktivita malyl-AMP ligázy vyžaduje ATP a Mg^{2+} ióny. Po analýze genómovej DNA druhov *Aureobasidium pullulans* bolo zistené, že v ich genómových DNA bol veľký DNA fragment, ktorý kodoval NRPS, vrátane ATC-ATC-TC-ATC-TC-TC domén. Doména A môže byť zodpovedná pre rozpoznávanie L-jablčnej kyseliny a aktiváciu na tvorbu malyl-AMP.

T (PCP) doména môže viazať kofaktor 4'-fosfopanteteín, na ktorý môže byť viazaný aktivovaný malyl-AMP. Doména C je potrebná pre tvorbu esterovej väzby medzi dvoma aktivovanými malyl-AMP. Doména TC môže byť terminačná doména, kde je syntetizovaná PMA uvoľnená. Gény kódujúce NRPS v druhoch *Aureobasidium* však ešte neboli identifikované a charakterizované, táto navrhovaná cesta nie je potvrdená [14].

2.3.3 Syntetická produkcia polyméru kyseliny jablčnej

2.3.3.1 Ring-opening polymerizácia

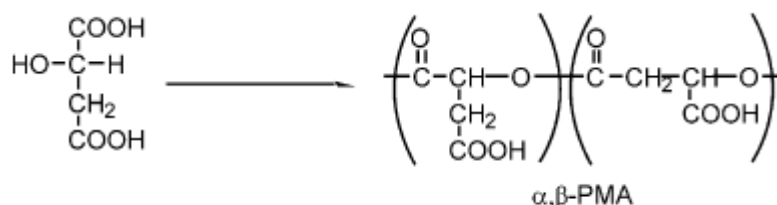
Touto metódou sa syntetizujú lineárne α a β polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou za použitia vhodných laktónových prekursorov. Výhody tejto metódy sú nízka reakčná teplota a krátka reakčná doba, avšak má aj nevýhody a to postup zahrňujúci niekoľko krokov a medziproduktov, ktoré sa musia čistiť [15].



Obrázok 2 Ring-opening polymerizácia s medziproduktom (poly(benzylester kyseliny jablčnej)) [15]

2.3.3.2 Polykondenzácia

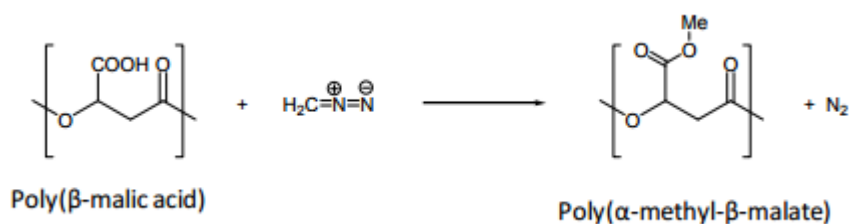
Na rozdiel od ring-opening polymerizácie, priama polykondenzácia zahŕňa iba jeden krok. Okrem toho, že je menej pracná, je tiež šetrnejšia pre životné prostredie, pretože používa menej organických činidiel v porovnaní s ring-opening polymerizáciou [15].



Obrázok 3 α,β -PMA syntetizovaná priamou polykondenzáciou z L-jablčnej kyseliny [15]

2.3.4 Aplikácia polyméru kyseliny jablčnej

PMA je všestranný materiál a môže byť použitý pre návrh palety nanokonjugátových platforiem pre cieleňú prepravu liečiv. Syntetický a tiež biosyntetický polymér kyseliny jablčnej je spontánne alebo enzymaticky degradabilný vo vodnom prostredí. Bez ohľadu na chiralitu, degradácia je mierna pri fyziologickom pH a rýchlejšie prebieha v kyslých ($\text{pH} < 5$) a zásaditých ($\text{pH} > 9$) roztokoch náhodným štiepením esterových väzieb hlavného reťazca až na konečný produkt degradácie, jablčnú kyselinu. Chemickým blokováním prívesných karboxylových skupín môžu byť vlastnosti polyméru kyseliny jablčnej zmenené a môže sa spomaliť rýchlosť hydrolýzy. Modifikácia PMA predstavuje veľkú výzvu kvôli labilnej povahe esterových väzieb hlavného reťazca, čo im dáva povinnosť vykonávať konkrétne reakcie v prípade, že je zachovaná molekulová hmotnosť. Chemickou modifikáciou závesnej postrannej karboxylovej skupiny môže byť nastavená celková hydrofóbnosť polyméru riadená parciálnou esterifikáciou, môžu byť tiež inkorporované biologicky aktívne ligandy vhodným činidlom. Metylácia s diazometánom sa ukázala byť ako účinná metóda na produkciu poly(α -methyl, β , L-jablčnej kyseliny) bez významného štiepenia polyesterového hlavného reťazca. Pri nízkom stupni metylácie sú produkty vo vode rozpustné, pričom pri 75 % metylácií závesných karboxylových skupín sú produkty stabilné a vo vode nerozpustné nanočastice, na ktorých môžu byť zavedené bielkoviny, prostredníctvom ktorých sa dodávajú látky do buniek. Rozpustné metylestery polyméru kyseliny jablčnej, ktoré obsahujú 25 % a 50 % metylovaných postranných karboxylových skupín, sú biologicky rozložiteľné a ich polčas rozpadu je obmedzený, takže môžu minimalizovať nepriaznivé odpovede hostiteľa. Kopolyméry rozrušujú membránu a umožňujú dodávať lieky priamo do intracelulárnych cieľov [16; 17].

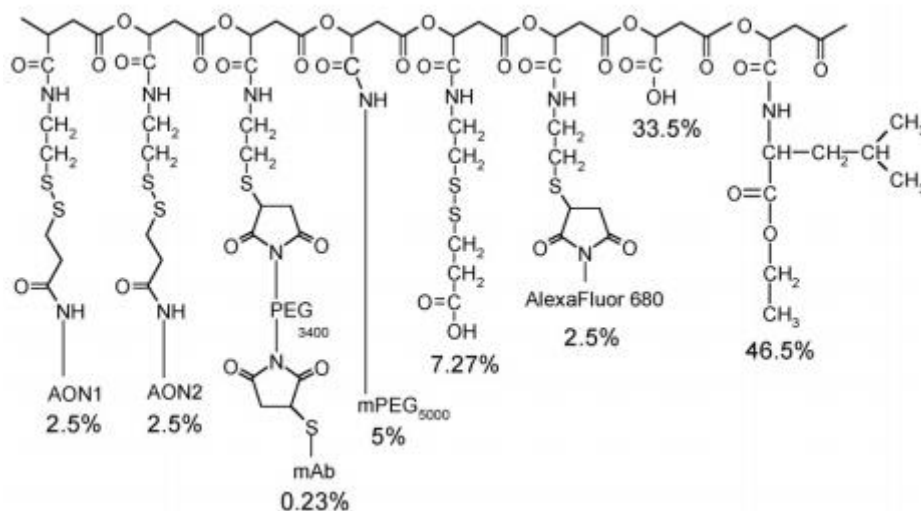


Obrázok 4 PMA metylová esterifikácia diazometánom [17]

Polymér kyseliny jablčnej a jeho deriváty boli použité ako platforma pri syntéze nanočastíc pre dodávku liečiv alebo ako hlavný reťazec v makromolekulárnych konjugátoch nesúcich niekoľko funkcionálít na liečbu ľudského mozgu a nádorov prsníka v modeloch

myší. Dospelo sa k záveru, že polymér kyseliny jablčnej je veľmi vhodný pre budovanie efektívnych systémov podávania liekov. Bolo tiež zistené, že metylované nanočastice polyjablčnej kyseliny uvoľňujú metanol a zvyšujú bunkovú toxicitu po dlhšom časovom období inkubácie, preto sa začínajú skúmať iné estery s menšou toxicitou [17].

Cielená dodávka liečiv je nový impulz v liečení nádorov liekmi, umožňuje zvýšenú účinnosť a znižuje systémovú toxicitu. Nanokonjugáty – kovalentné komplexy, ponúkajú vynikajúcu kontrolu riadneho doručenia liekov do nádorov s minimálnymi vedľajšími účinkami. Na syntézu konjugátov sa zaviedol polymér kyseliny jablčnej. Nanokonjugát Polycefín bol syntetizovaný pre cielené dodávanie oligonukleotidov a protilátok do určitých nádorov a pozostáva z niekoľkých funkčných jednotiek, chemicky konjugovaných do karboxylových skupín PMA platformy. Ich funkcie dovoľujú Polycefinu prechod krvnou bariérou nádoru, spojenie s bunkovým povrchom nádoru, rozrušenie endozomálnej membrány a ochránenie pred enzymatickou degradáciou v cievnom systéme. Nanokonjugát je voliteľne spojený s fluorescenčným farbivom kvôli sledovaniu jeho dráhy pri liečbe nádoru. Polycefín bol navrhnutý na prepravu viac ako jedného lieku, čo umožňuje synergické účinky na nádorové bunky. Táto stratégia vedie k účinnému blokovaniu syntézy nádorových buniek z proteínových komplexov zložených z odlišných polypeptidových reťazcov [18].



Obrázok 5: Polycefín [18]

2.4 Polymér kyseliny glutámovej

Polymér kyseliny glutámovej (PGA) je biologicky odbúrateľný, neimunogenetický a neobvyklý aniónový polyamid, ktorý je vyrobený z D- alebo L- jednotiek glutámovej kyseliny. Biopolyméry vytvorené spojením aminokyselín sú veľmi podobné proteínom,

nemajú však špecifickú sekvenciu. Štruktúra je tvorená aminokyselinami, ktoré tvoria polyméry s molekulovými hmotnosťami tak rozmanitými, ako majú aj polysacharidy. PGA môže byť diferencovaná do dvoch izoformiem, α -PGA a γ -PGA, v závislosti na pripojení karboxylovej skupiny. α -PGA môže byť získaná chemickou syntézou a γ -PGA je produkovaná iba mikrobiálnou fermentáciou [19].

2.4.1 Glutámová kyselina

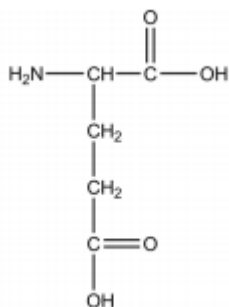
2.4.1.1 L-glutámová kyselina

Kyselina glutámová (Glu) je jedna z dvadsiatich proteogenných aminokyselín. Hrá významnú úlohu pri intra- a intermolekulárnych interakciách proteínov, peptidov a enzýmov. Glutámová kyselina je dôležitým mediátorom v centrálnom nervovom systéme. Jej najvyššia koncentrácia (10-15 $\mu\text{mol/g}$ tkaniva) je v šedej mozgovej kôre. Všetky mozgové bunky majú kyselinu glutámovú v cytosole a mitochondriách. Zabezpečuje zmyslové informácie, motorickú koordináciu, emócie a poznávanie. Jej schopnosť je tvoriť záporne nabitý postranný reťazec – glutamát. Glutamát sa vyskytuje vo veľkom množstve vo voľných aj viazaných formách v potravinách – v mäse, rybách, syroch, mlieku, paradajkách, hubách, tiež v zelenine, napríklad v hrášku a brokolici. Viazané formy glutamátu, spojené s inými aminokyselinami sa vyskytujú v svaloch, vlasoch a pokožke. Glutamát v ľudskom tele je nevyhnutný na reparáciu bielkovín, regeneráciu a rast. Syntetizuje sa v tele cez transamináciu α -ketoglutarátu prijímaním aminoskupín z aminokyselín. Prvotne bol produkovaný hydrolýzou pšenice, lepku alebo zo sójových bôbov. Veľké množstvo je vyrobené fermentáciou melázy z cukrovej repy alebo cukrovej trstiny. Nepatogénne druhy baktérií *Corynebacterium*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium*, *Arithobacter* a *Microbacterium* sú schopné produkovať L-glutamát [20; 21].

2.4.1.2 D-glutámová kyselina

D-glutámová kyselina nie je endogénne produkovaná vo vyšších cicavcoch, vyskytuje sa prirodzene hlavne v bunkových stenách niektorých baktérií. D-glutamát je prítomný v potravinách, napr. v sójových bôboch a vzniká tiež premenou v mikroflóre tráviaceho traktu, ktorého bunkové steny obsahujú významné množstvo D-glutamátu. Na rozdiel od iných D-aminokyselín nie je oxidovaný pomocou oxidáz D-aminokyselín a preto táto detoxikačná metóda nie je dostupná pre D-glutamát. Voľný D-glutamát sa nachádza v tkanivách cicavcov v prekvapivo vysokom množstve, pričom 9 % z celkového glutamátu

prítomného v pečeni je táto izomerná forma. Jeho značná akumulácia v telesných tekutinách by znižovala celý rad dôležitých fyziologických procesov – je to najúčinnější prírodný inhibítor syntézy glutatiónu [22].



Obrázok 6 Neutrálna forma kyseliny glutámovej [20]

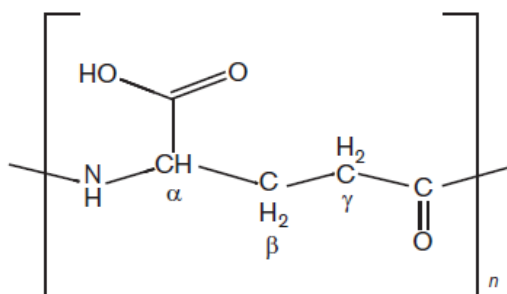
2.4.2 α -PGA

α -PGA je unikátna v tom, že je zložená z prirodzene sa vyskytujúcej L-glutámovej kyseliny spojenej dohromady prostredníctvom amidových väzieb a nie nerozložiteľnými uhlíkovými väzbami hlavného reťazca. Voľne visiace γ -karboxylové skupiny v každej opakujúcej sa jednotke L-glutámovej kyseliny sú negatívne nabité pri neutrálnej hodnote pH, vďaka čomu je polymér rozpustný vo vode. Karboxylové skupiny tiež poskytujú funkcie na pripevnenie liekov. Tento polymér je kvôli biologickej rozložiteľnosti a netoxickým vlastnostiam vhodný pre biomedicínske využitie. Výkonnosť môže byť zlepšená úpravou architektonickej štruktúry pri zachovaní jej užitočných vlastností – rozpustnosti vo vode, karboxylovej funkcionality, biokompatibility a biodegradability [23].

2.4.3 γ -PGA

γ -PGA je prirodzene sa vyskytujúci biopolymér syntetizovaný rôznymi mikrobiálnymi kmeňmi, obzvlášť rodu *Bacillus*. Je to homopolyamid, zložený z monomérov kyseliny glutámovej spojených amidovými väzbami medzi α -amino a γ -karboxylovými skupinami. Polymér môže byť získaný buď v L- alebo D- alebo oboch izomerických formách, v závislosti na bakteriálnom kmeni alebo na produkčnom médiu používanom pri jeho produkcii. γ -PGA je vo vode rozpustná, aniónová, biologicky rozložiteľná a netoxická. γ -PGA a jej deriváty sú preto zaujímavé pre širokú škálu priemyselných odvetví, ako sú potraviny, kozmetika, medicína a čistenie vôd. γ -PGA má vysokú relatívnu molekulovú hmotnosť ($M_r=100\,000$ až $1\,000\,000$). Amidová väzba medzi týmito jednotkami je vytvorená medzi α -amino skupinou a γ -karboxylovou skupinou. γ -PGA je preto odolná voči

rozpadu proteázami, ktoré rozpoznávajú iba α -amidovú väzbu. Ďalší rozdiel oproti proteínom je, že γ -PGA nie je tvorená sekvenčnými procesmi transkripcie a translácie, ale membránovo viazaným γ -PGA-syntázou komplexom katalyzujúcim polymerizáciu L-glutámovej kyseliny do γ -PGA spôsobom nezávislým od ribozómu [24; 25; 26].



Obrázok 7 Štruktúra γ -PGA [27]

2.4.4 Biotechnologická produkcia polyméru glutámovej kyseliny

γ -PGA je syntetizovaná grampozitívnymi baktériami a je produkovaná ako extracelulárny polymér niekoľkými bakteriálnymi druhmi, napr. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* a ďalšími organizmami. Syntéza γ -PGA má rôzne fyziologické funkcie. Pre patogénne kmene, ako sú *Bacillus anthracis* alebo *Staphylococcus epidermis*, je syntéza povrchovo asociovej γ -PGA esenciálna pre virulenciu, pretože tvorba γ -PGA kapsule zabraňuje prístupu protilátok do baktérií. Bacile žijúce v pôde, ako je napríklad *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*, produkujú extracelulárnu aniónovú γ -PGA, ako viskóznú slizkú vrstvu, do ktorej môžu byť imobilizované toxické ióny kovov. γ -PGA produkovaná baktériami v skorej stacionárnej fáze rastu môže byť použitá ako zdroj uhlíka a dusíka v neskoršej stacionárnej fáze. γ -PGA je potom degradovaná depolymerázou alebo hydrolázou. Halofilné Archea vylučujú vysoko hygroskopickú γ -PGA na zvýšenie dostupnosti vody v slanom mikro-prostredí bunky [3; 19; 28].

Mikrobiálna produkcia α -PGA je náročná a polymér môže byť produkovaný len rekombinantnou technológiou. Krátky α -PGA polypeptid bol vyrobený ribozomálnou syntézou pomocou umelého génu ako šablóny v rekombinantnom kmeni *Echerichia coli* [19].

2.4.4.1 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis je gram-pozitívna, sporulujúca baktéria, široko distribuovaná ako saprofytický organizmus v životnom prostredí. Na rozdiel od väčšiny ostatných baktérií, ktoré sú prevažne aeróbne, *Bacillus licheniformis* je fakultatívne anaeróbna. Určité izoláty *Bacillus licheniformis* sú schopné denitrifikácie. *Bacillus licheniformis* tvorí kolónie stredného priemeru (2-4 mm), nepravidelného tvaru, pričom môžu byť vlhké a maslovité alebo slizovité. Okraje kolónií sa menia od vlnitých, vláknitých, cez membránové, s podkladovou hlienovitou matricou. Tieto kolónie majú tendenciu byť adherentné. Existuje mnoho komerčných a poľnohospodárskych využití pre tento mikroorganizmus a jeho mimobunkové produkty. Tento druh sa používa už niekoľko desaťročí pri výrobe priemyselných enzýmov, vrátane niekoľkých proteáz, α -amyláz, penicillináz, pentozanáz, cykloglukosyltransferáz, β -manázy a niekoľko pektolytických enzýmov. Špecifické kmene *Bacillus licheniformis* sa tiež používajú na výrobu peptidových antibiotík, ako je bacitracín a proticín, spolu s množstvom špeciálnych chemikálií, ako je kyselina citrónová, inozín, kyselina inozínová a polymér kyseliny glutámovej. Ako baktérie tvoriace endospóry majú schopnosť prežiť za nepriaznivých podmienok okolitého prostredia. *Bacillus licheniformis* je možné odlíšiť od iných baktérií na základe metabolických a fyziologických testov. Avšak biochemické a fenotypové charakteristiky nemusia byť jednoznačné medzi príbuznými druhmi. Taxonomické štúdie ukazujú, že *Bacillus licheniformis* je úzko spojená s *Bacillus subtilis* a *Bacillus amyloliquefaciens* na základe porovnania 16 S rDNA a 16S-23S vnútorne transkribovaného spaceru nukleotidovej sekvencie. γ -PGA pochádzajúca z tohto mikroorganizmu má flexibilnú konformáciu, ktorá je závislá na pH a koncentrácii γ -PGA. Pod pH 7 existuje štruktúra γ -PGA hlavne z α -skrutkovice. Nad pH 7 sú tvorené β -skladané listy, v tejto konformácii sú negatívne náboje efektívnejšie voľné [29; 30; 31].

2.4.4.2 Mechanizmus biosyntézy

Biosyntéza v γ -PGA baktériach sa vykonáva v dvoch krokoch. V prvom kroku sú syntetizované L- a D-glutámové kyseliny. Tieto jednotky glutámovej kyseliny sú spojené dohromady v druhom kroku amidovými väzbami medzi α -amino a γ -karboxylovou kyselinou. Jednotky L-glutámovej kyseliny, ktoré tvoria γ -PGA môžu byť získané endogénne alebo exogénne. Endogénna produkcia L-glutámovej produkcie vyžaduje konverziu zdrojov uhlíka cez acetyl-CoA a medziproduktov Citrátového cyklu. α -ketoglutárové kyseliny z Citrátového cyklu slúžia ako priamy prekursor syntézy kyseliny glutámovej. Pri exogénnej

produkcii môže byť L-glutámová kyselina prevedená na L-glutamín pomocou enzýmu glutamínsyntetáza. L-glutamín je taktiež prekursorom γ -PGA. Proces γ -PGA syntézy je zložený zo 4 rôznych fáz: γ -PGA racemizácia, γ -PGA polymerizácia, γ -PGA regulácia a γ -PGA degradácia [27].

γ -PGA racemizácia - Ako už bolo uvedené v sekcii 2.4.4.2, γ -PGA môže mať L a D alebo oba L, D enantioméry kyseliny glutámovej v rôznych množstvách. Na začlenenie D-glutámovej kyseliny do reťazca γ -PGA je potrebné jej získanie z L-glutámovej kyseliny racemizáciou. *Bacillus subtilis* má dva homológy génu glutamátracemázy – *racE*/*glr* a *yrpC*. Funkcia týchto génov nie je stále istá, pretože sa líšia správy o dôležitosti každého génu. RacE je cytosolický enzým s vysokou selektivitou na kyselinu glutámovú a preferenciou na L-glutámovú kyselinu. RacE je dôležitý len pre rast v komplexnom médiu, zatiaľ čo *yrpC* je aktívny, len ak sú bunky pestované v minimálnom médiu. Ani jednému z týchto dvoch génov glutamátracemázy nebola zistená zodpovednosť za syntézu γ -PGA, aj keď sa oboje zdali byť nevyhnutné pre katabolizmus D-glutamátu. Naopak, iní vedci zistili, že *glr* gény sú nevyhnutné pre konverziu L-glutamátu na D-glutamát pre syntézu γ -PGA a peptidoglykán, ako aj rast v *Bacillus subtilis*. Výskumy ukázali, že Mn^{2+} ovplyvňuje enantiomérne zloženie γ -PGA zmenou expresie *glr* génu. Pomer medzi L- a D-glutamátom v γ -PGA *Bacillus licheniformis* tiež závisí od koncentrácie Co^{2+} a Zn^{2+} . Vedci tiež potvrdili závislosť enantiomernej kompozície γ -PGA na Mn^{2+} v *Bacillus licheniformis* a tiež *Bacillus subtilis* [27].

γ -PGA polymerizácia - Polyglutamát syntáza (Pgs) je kódovaná pomocou štyroch génov (*pgsB*, *C*, *A* a *E*) a ich homológy v rode *Bacillus* sú *ywsC*, *ywtAB* a *capBCA*. Nedávno bolo zistené, že *pgsBCA* je zodpovedný za γ -PGA polymerizáciu na aktívne miesto komplexu syntázy (PgsBCA) v ATP dependentnej reakcii. *PgsB* a *pgsC* tvoria hlavné časti katalytického miesta, zatiaľ čo *pgsA* odstraňuje predĺžený reťazec z aktívneho miesta, ktoré je potrebné pre pridanie ďalšieho monoméru a transportu γ -PGA cez kompaktnú bunkovú membránu. Bolo zistené, že rola *pgsE* v produkcii γ -PGA je postrádateľná a pri vysokých koncentráciách *pgsB*, *pgsC* a *pgsA* prebieha tvorba γ -PGA v neprítomnosti *pgsE*. Avšak, iní vedci zistili, že gén *pgsE* je nevyhnutný pre produkciu γ -PGA v prítomnosti Zn^{2+} [32].

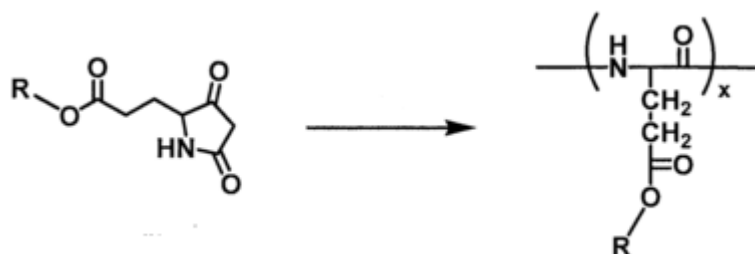
γ -PGA regulácia - γ -PGA syntéza je regulovaná dvoma signál-transdukčnými systémami: ComP-ComA regulátorom, dvojdielnym DegS-DegU, DegQ a SwrA systémom. Úloha DegQ bola dôkladne preskúmaná a striedanie *degQ* zabraňuje syntéze γ -PGA a účinne znižuje expresiu produkcie degradačných enzýmov. Vzťah medzi SwrA a DegU zostáva

slabo pochopený. Prítomnosť SwrA a fosforylovaného DegU (DegU-P) by mohla plne aktivovať pgs operón pre γ -PGA produkciu, ale účinok každého génu na pgs transkripciu a γ -PGA produkciu bol zanedbateľný. Naopak, iní vedci zistili, že vysoká úroveň DegU-P môže priamo aktivovať pgs expresiu pre γ -PGA produkciu namiesto SwrA. Vo všeobecnosti, DegS-DegU, DegQ a ComP-ComA sú zapojené do regulácie transkripcie, zatiaľ čo SwrA pôsobí v post-transkripčnej úrovni [32].

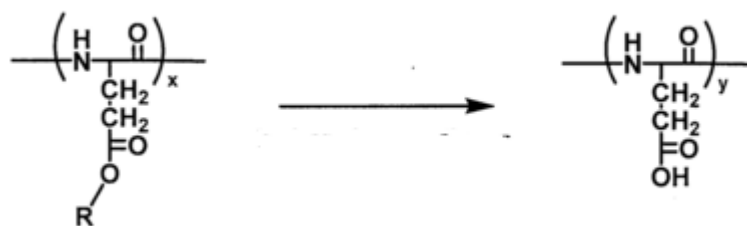
γ -PGA degradácia - Množstvo enzýmov bolo spojených s degradáciou γ -PGA. γ -glutamyl-transpeptidázy (GMT) sú enzýmy, ktoré prevádzajú γ -glutamyl skupinu od donora k akceptoru (peptidy a aminokyseliny) prostredníctvom vytvorenia medziproduktu γ -glutamyl enzýmu v reakcii transpeptidácie. Enzým má schopnosť vykonávať exohydrolázovú aktivitu voči γ -PGA a uvoľnená glutámová kyselina je použitá baktériou ako zdroj uhlíka a dusíka [27].

2.4.5 Syntetická produkcia polyméru glutámovej kyseliny

α -PGA sa syntetizuje chemicky nukleofilne iniciovanou polymerizáciou γ chráneného N-karboxyanhydridu L-glutámovej kyseliny za vhodného iniciátoru. N-karboxyanhydrid môže byť pripravený vo vysokých výťažkoch. Môžu byť použité rôzne chrániace skupiny esteru (R), napríklad benzyl, fenyl, t-butyl, isopropyl, ethyl, methyl, propionyl. Chrániace skupiny sa odstraňujú pridaním HBr a kyseliny trifluóroctovej v danom poradí. Polymerizačná reakcia sa uskutočňuje v aprotickom rozpúšťadle, ako je toluén alebo chlórované alkány a je iniciovaná prídavkom primárneho amínu. Touto reakciou vzniká východisková kyselina – ester polyméru glutámovej kyseliny. Východisková kyselina môže hydrolyzovať za vzniku polyglutámovej kyseliny pri hydrolyzačných podmienkach (čas, teplota, rozpúšťadlá, hydrolyzujúce činidlá) [19; 33].



Obrázok 8 Nukleofilná polymerizácia monoméru esteru glutámovej kyseliny N-karboxyanhydridu v prítomnosti iniciátora [33]



Obrázok 9 Hydrolyza pri hydrolyzačných podmienkach za vzniku α -PGA [33]

2.4.6 Aplikácia polyméru glutámovej kyseliny

γ -PGA sa používa v potravinárskom priemysle, konkrétne v prirodzene sa vyskytujúcom slize natto (fermentovaných sójových bôboch), ale aj ako doplnok stravy, činidlo s prevenciou proti osteoporóze či kryoprotektant. Ako kryoprotektant γ -PGA zvyšuje životaschopnosť probiotických baktérií v priebehu sušenia vymrazovaním. Bolo zistené, že γ -PGA chráni *Lactobacillus paracasei* efektívnejšie ako sacharóza, trehalóza alebo sorbitol. γ -PGA by ako doplnok stravy mohla účinne zvýšiť biologickú dostupnosť vápnika zvýšením jeho rozpustnosti a vstrebávania v čreve, čo zníži stratu kostnej hmoty u ľudí [32].

PGA je potenciálny biosorbent pre odstránenie a obnovu ťažkých kovov z priemyselných a odpadových vôd, vďaka svojej schopnosti viazať niekoľko iónov kovov (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+}). Ako aplikácie boli vyvinuté mikrofiltračné membrány s kovalentne pripojenou PGA, ktoré majú extrémne vysokú kapacitu pre absorpciu ťažkých kovov. γ -PGA z *Bacillus licheniformis* bola použitá k absorpcii Cu^{2+} a bolo zistené, že γ -PGA vykazuje veľkú afinitu k Cu^{2+} iónom a má vysokú väzbovú kapacitu [3].

Poly(aminokyseliny) sú zaujímavé ako platformy na dodávanie liečiv, kvôli ich biokompatibilite a biodegradácii k prirodzene sa vyskytujúcim biologickým produktom. PGA (α - alebo γ -forma) je tiež vo vode rozpustná a netoxická. Má karboxylové skupiny na postranných reťazcoch, ktoré ponúkajú úchyty na konjugáciu chemoterapeutických činidiel, čím sa toto liečivo stáva viac rozpustné a spravovateľné. Konjugát α - alebo γ -PGA-liečivo môže vstúpiť do oblastí s nádorom a liek je uvoľňovaný v priebehu času, ako polymér biodegraduje. Kyselina glutámová potom môže vstúpiť do normálneho bunkového metabolizmu a nie je vylučovaná obličkami. Široká škála protirakovinových činidiel bola konjugovaná do γ -PGA a výsledné konjugáty boli testované. Napríklad použitím γ -PGA-paclitaxel konjugátu (PG-TXL) bola u zvierat zaznamenaná úplná regresia nádoru v rakovine vaječníkov i pŕs po vpíchnutí jedinej intravenózneho injekcie s vysokým obsahom

PG-TXL. Paclitaxel (Taxol, TXL) je prírodné antimikrotubulačné činidlo extrahované z ihličia a kôry *Taxis brevidolia* a je chemoterapeutické činidlo so silným protinádorovým účinkom. Hlavným problémom pri klinickom použití paclitaxelu bola jeho nerozpustnosť vo vode, ktorý sa prekonal konjugovaním s α - alebo γ -PGA [27; 34].

Syntetické alebo semisyntetické chirurgické lepidlá trpia rôznymi nedostatkami – nízkou rýchlosťou degradácie a indukciou chronického zápalu. Lepidlá založené na fibríne sú v súčasnosti najčastejšie používané, avšak pokiaľ bude fibrín vyrábaný z ľudskej krvi, pretrváva riziko vírusovej infekcie. Tieto lepidlá sa používajú na lepenie tkanív, hemostázu a na tesnenie vzduchu a úniku telových tekutín počas operácií. Chemické zosieťovanie želatíny a γ -PGA alebo α -PGA sa preukázalo ako sľubné chirurgické lepidlo a hemostatické činidlo a môže byť potenciálnou náhradou fibrínu. Štúdie na zvieratách ukázali, že takéto hydrogély sú v tele pomaly degradované bez náznaku žiadnych závažnejších zápalových reakcií. Bolo dokázané, že takéto lepidlo stuhne rovnako rýchlo ako fibrín a je efektívnejšie v zabraňovaní úniku vzduchu z pľúc [19; 27].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité mikrobiálne kmene, chemikálie a prístrojové vybavenie

3.1.1 Produkčné mikroorganizmy

K experimentálnej produkcii polyméru kyseliny jablčnej bola použitá kultúra kvasinky *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 získaná z Českej zbierky mikroorganizmov Prírodovedeckej fakulty Masarykovej univerzity v Brne a *Aureobasidium pullulans* DSM 3497, pochádzajúci z Leibniz Inštitútu DSZM - Nemeckej zbierky mikroorganizmov a bunkových kultúr GmbH. Na produkciu polyméru glutámovej kyseliny bola využívaná baktéria *Bacillus licheniformis* CCM 2206 zadovážená z Českej zbierky mikroorganizmov Prírodovedeckej fakulty Masarykovej univerzity v Brne.

3.1.2 Použité chemikálie, materiál, štandardy

V experimentálnej časti tejto práce boli používané tieto chemikálie, materiál a štandardy:

- 3,5-dinitrosalicylová kyselina, Sigma-Aldrich, Nemecko
- Agar powder, Himedia, India
- Beef extract, Himedia, India
- Cetylmetylamónium bromid (CTAB), Sigma-Aldrich, Nemecko
- Citrónan sodný p.a., Lachema, ČR
- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., LachNer, ČR
- Glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner, ČR
- Glutamát sodný-L-glutámová kyselina, Sigma-Aldrich, Nemecko
- Glycerol bezvodý, Lach-Ner, ČR
- Hydrogenfosforečnan didraselný, Lach-Ner, ČR
- Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát, Penta, ČR
- Hydroxid sodný perličkový, p.a., Lach-Ner, ČR
- Chlorid amónny, Lach-Ner, ČR
- Chlorid draselný p.a., Lachema, ČR
- Chlorid manganatý hexahydrát, Lachema, ČR
- Chlorid sodný p.a., Lachema, ČR
- Chlorid vápenatý p.a., Lachema, ČR

- Chlorid železitý heptahydrát, Lach-Ner, ČR
- Kyselina L-jablečná, Sigma-Aldrich, Nemecko
- Kyselina sírová, 96%., Lach-Ner, ČR
- Laktóza p.a, Lach-Ner, ČR
- Nutrient Broth, Himedia, India
- Pepton, Himedia, India
- Perie hydínové
- Síran amonný p.a., Lach-Ner, ČR
- Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR
- Síran manganatý monohydrát
- Srvátka, mliekareň Pribina a.s., ČR
- Štandard kyseliny polyglutámovej, Sigma-Aldrich, Nemecko
- Uhličitan vápenatý, Lachema, ČR
- Vínan draselno-sodný tetrahydrát, Penta, ČR
- Yeast Autolysate, Himedia, India
- Yeast Extract, Himedia, India

3.1.3 Prístroje a pomôcky

V experimentálnej časti tejto práce boli používané tieto prístroje a pomôcky:

- Analytické váhy BAS 31, Boeco, Nemecko
- Centrifúga Hettich Zentrifugen, Nemecko
- Centrifúga U-32R, Boeco, Nemecko
- ELISA ReaderBio Tek ELx808
- Inkubátor IP60 UF 60L, Scientific laboratory supplies, UK
- Iónový chromatograf 850 Professional IC Anion, Metrohm, Švajčiarsko
- Kolóna Metrosep Organic Acids - 250/7.8, Metrohm, Švajčiarsko
- Laboratórne sklo
- Laminárny box Aura mini, Bioair Instruments, UK
- pH meter Sensodirect 200, Lovibond, USA
- Spektrofotometr UV-VIS Helios α , Unicam, UK
- Temperovaná trepačka ES-20, Biosan, Lotyšsko
- Temperovaná trepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom, ČR

- Ultrazvuk PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic, SR
- Váhy Kern EW 620-3NM, Nemecko
- Vodný kúpeľ TW2, Julabo, Nemecko
- Vortex TK3S, Kartel spa, USA

3.2 Hydrolýza odpadových substrátov

3.2.1 Enzymatická hydrolýza srvátky

Srvátka bola hydrolyzovaná 0,5 obj. % proteázou po dobu 24 hodín na trepačke s 180 rpm, temperovanej na 50 °C.

3.2.2 Chemická hydrolýza peria

Hydinové perie bolo hydrolyzované v Erlenmayerovej banke o objeme 250 ml. Do tejto banky bolo prevedených 100 ml 0,5 M roztoku hydroxidu sodného (2 g NaOH v 100 ml destilovanej vody) a 6 g nastrihaného hydínového peria. Zmes bola premiešaná, banka bola uzavretá zátkou a umiestnená do mikrovlnnej rúry po dobu 7 minút. Po skončení hydrolýzy bol obsah banky o výslednej koncentrácii 60 g/l peria prefiltrovaný za zníženého tlaku cez Büchnerov lievnik a filtrát zneutralizovaný kyselinou sírovou.

3.3 Kultivácia kmeňov *Aureobasidium pullulans*

3.3.1 Tuhé uchovávacie médium

K dlhodobému uchovaniu kmeňov *Aureobasidium pullulans* bolo použité YPD médium s obsahom agaru o koncentrácii 20 g/l. Na vopred pripravené, stuhnuté médium na Petriho miskách bola asepticky očkovaná bakteriálna kultúra. Tieto zaočkované misky boli ponechané po dobu 24 hodín pri teplote 30 °C a následne prenesené do chladničky a uchované pri teplote 4 °C.

3.3.2 Príprava inokula

Prvým krokom kultivácie mikroorganizmov bolo jeho prenesenie z uchovávacieho média do inokula. Kultivácia inokula prebiehala na trepačke temperovanej na teplotu 30 °C pri 180 rpm, v priebehu 24 hodín. K príprave inokula bolo použité YPD médium o objeme 50 ml v 100 ml Erlenmayerových bankách, sterilizované pri 121 °C po dobu 20 minút, so zložením uvedeným v nasledujúcej tabuľke:

Tabuľka 1 Zloženie YPD média

zlúčenina	koncentrácia (g/l)
yeast bacteriology	10
glukóza	20
pepton	20

3.3.3 Príprava produkčného média

Kultivácia mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans* prebiehala v rôznych produkčných médiach v závislosti od sledovaných efektov rozličných uhlíkatých a dusíkatých zdrojov na rast buniek a produkciu polyméru kyseliny jablčnej. Boli používané 100 ml Erlenmayerové banky obsahujúce 50 ml produkčného média (Tabuľka 2), do ktorého bolo v laminárnom boxe pridané inokulum o objeme 10 obj. %. Zaočkované produkčné médium bolo inkubované pri 30 °C na trepačke (180 rpm) po dobu 72 hodín, následne bol experiment ukončený. Zloženia produkčných médií sú uvedené v tabuľkách:

Tabuľka 2 Produkčné médium I

zlúčenina	koncentrácia (g/l)
NaNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,1
KCl	0,5
glukóza	90

Tabuľka 3 Produkčné médium II

zlúčenina	koncentrácia (g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
KH ₂ PO ₄	0,50
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,34
yeast autolysate	0,70
glukóza	60

3.3.4 Štúdium efektov počiatocnej koncentrácie glukózy na produkciu PMA

Pre tento experiment boli využívané kmene *Aureobasidium pullulans* DSM 3497, *Aureobasidium pullulans* CCM 8182. Rôzne počiatocné koncentrácie glukózy (60, 90, 120 a 150 g/l) boli aplikované pre *Aureobasidium pullulans* CCM 8182. Vplyv týchto koncentrácií bol sledovaný pri dvoch nezávislých kultiváciach, keď pri prvom experimente bol navyše do produkčného média pridaný uhličitan vápenatý o koncentracii 30 g/l. Koncentrácie glukózy 120 a 150 g/l boli už pomerne vysoké, preto sa pri kultivácii *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 pracovalo len s glukózou o koncentracii 60, 80 a 90 g/l. Produkčné médium I (Tabuľka 2) bolo vysterilizované najskôr bez prídavku glukózy. Tá sa pridávala vo vypočítanom množstve až v laminárnom boxe z aseptického zásobného roztoku o koncentracii 60 g/100 ml glukózy a objem produkčného média bol doplnený sterilizovanou destilovanou vodou na objem 50 ml. Následne bolo toto produkčné médium očkované 10 obj. % inokula. Kultivácie prebiehali na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a rýchlosti 180 rpm v 100 ml Erlenmayerových bankách obsahujúcich 50 ml produkčného média a bola ukončená po 72 hodinách. Boli vykonané stanovenia koncentrácie biomasy, extracelulárnych produktov a zvyškovej koncentrácie glukózy. Postupy pre tieto stanovenia sú uvedené v kapitolách 3.3.7, 3.3.8 a 3.3.9.

3.3.5 Štúdium efektu rôznych suplementov na bunkový rast a produkciu PMA

Bolo vykonané testovanie rôznych zdrojov uhlíka, dusíka a ďalších prekursorov tvorby polyméru kyseliny jablčnej za stálej koncentrácie glukózy. V tejto štúdii boli použité dve inokulá. 24 hodinové inokulum I bolo zaočkované do média s takým istým zložením – inokulum II. Na experiment bolo použité produkčné médium I (Tabuľka 2) s glukózou 60 g/l a yeast extraktom o koncentracii 3 g/l. V prvom experimente bola glukóza nahradená laktózou o koncentracii 60 g/l. Ďalej sa skúmal vplyv prídavku uhličitanu vápenatého o koncentracii 30 g/l a kyseliny fumarovej o koncentracii 3 g/l za stálej koncentrácie glukózy 60 g/l. V ďalšom experimente bol dusičnan sodný nahradený dusičnanom amónnym a posledná banka obsahovala produkčné médium II (Tabuľka 3). Experiment prebiehal 72 hodín pri 30 °C na temperovanej trepačke pri 180 rpm. Sušina bola stanovená gravimetricky. Supernatant získaný po centrifugácii bol použitý pre stanovenie koncentrácie extracelulárnych produktov a zvyškových koncentrácií redukujúcich sacharidov.

3.3.6 Použitie srvátky a peria – odpadových substrátov v produkcii PMA

Na tento účel bola využívaná hydrolyzovaná aj nehydrolyzovaná srvátka, ktorá mohla slúžiť ako zdroj uhlíka a dusíka. Experiment bol vykonávaný na kmeňoch mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 a *Aureobasidium pullulans* CCM 8182. Pre kultiváciu bolo využívané produkčné médium I (Tabuľka 2). Pri nehydrolyzovanej srvátke s kmeňom *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 bolo využívané produkčné médium I s prídavkom yeast extraktu o koncentrácii 3 g/l. Bola prichystaná séria 5 Erlenmayerových baniek, do ktorých bolo navážené množstvo zložiek produkčného média na celkový objem 50 ml. V prvej Erlenmayerovej banke boli tieto komponenty zaliate 100 obj. % srvátky, v druhej banke bol prídavok 50 obj. % srvátky, zvyšok predstavovala destilovaná voda a glukóza s celkovou koncentráciou 40 g/l. Tretia Erlenmayerová banka obsahovala 10 obj. % srvátky a ostatok tvorila destilovaná voda a glukóza s výslednou koncentráciou 90 g/l v 50 ml roztoku. Vo štvrtej banke sa nachádzalo také isté zloženie ako v tretej, avšak bez prídavku yeast extraktu. Piata Erlenmayerová banka bola kontrolná, bez srvátky, s koncentráciou glukózy 90 g/l.

Hydrolyzovaná srvátka bola použitá pre kmeň *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 s využitím produkčného média I (Tabuľka 2). Komponenty produkčného média boli zväžené do 4 Erlenmayerových baniek. Pokus bol v prvých troch bankách vykonávaný rovnako, ako pri nehydrolyzovanej srvátke, a teda aplikácia 100 obj. % srvátky, 50 obj. % srvátky s 40 g/l glukózy a 10 obj. % srvátky s 90 g/l glukózy. Štvrtá banka bola kontrolná s koncentráciou glukózy 90 g/l.

Chemicky hydrolyzované hydínové perie slúžilo ako zdroj dusíka. Do komponentov produkčného média I bolo pridaných 10 obj. % hydrolyzátu peria, ostatok tvorila destilovaná voda a glukóza s koncentráciou 90 g/l. Experiment bol uskutočnený s použitím a bez použitia yeast extraktu (3 g/l). U všetkých experimentov prebiehala kultivácia po dobu 72 hodín na temperovanej trepačke s 30 °C a 180 rpm.

3.3.7 Analýza biomasy

Po 72 hodinovej kultivácii mikroorganizmu bolo z Erlenmayerových baniek odobratých 10 ml vzorku k stanoveniu koncentrácie biomasy gravimetrickou metódou. Vzorky boli scentrifugované pri 10 000 rpm po dobu 5 minút, supernatant bol uchovaný na analýzu zvyškových sacharidov a extracelulárnych produktov. Precipitant – bunková biomasa bola vysušená pri 75 °C v sušiarňi do konštantnej hmotnosti a zvážená na analytických váhach. Obsah bol prepočítaný na jednotku g/l.

3.3.8 Stanovenie koncentrácie extracelulárnych produktov gravimetricky

Mikroorganizmus *Aureobasidium pullulans* produkuje polymér kyseliny jablčnej a tiež extracelulárny polysacharid pullulan. Koncentrácia extracelulárnych produktov bola určená ako zmes týchto dvoch polymérov. Polyméry boli separované zo supernatantu etanolovou precipitáciou a následným scentrifugovaním. Dva objemy vychladeného etanolu boli zmiešané s jedným objemom vzorku a inkubované pri 4 °C v chladničke na 30-60 minút. Vyzrážané polyméry boli scentrifugované pri 6 000 rpm po dobu 10 minút. Precipitant bol umiestnený do sušiarne s teplotou 75 °C a sušený do konštatnej hmotnosti. Množstvo extracelulárnych produktov bolo určené zvážením suchého precipitantu na analytických váhach a následným prepočtom na jednotku g/l.

3.3.9 Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny

Táto metóda je založená na reakcii 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny s redukujúcimi sacharidmi za vzniku 3-amino-5-nitrosalicylovej kyseliny, ktorá silne absorbuje svetlo pri 540 nm [35].

3.3.9.1 Príprava roztokov a vzoriek

Na prípravu roztoku 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny boli navážené 2 g tejto kyseliny, ktorá bola rozpustená v 100 ml destilovanej vody a 40 ml 2 M NaOH. Po rozpustení kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej bolo do roztoku pridané 60 g vínanu sodnodraselného a objem bol doplnený destilovanou vodou na 200 ml.

Supernatanty boli po centrifugácii použité ako vzorky pre stanovenie koncentrácie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Pri stanovení bolo použité 0,5 ml vhodne nariadenej vzorky a 0,5 ml pripraveného činidla 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Vzorky boli zahrievané vo vodnom kúpeli o teplote 70 °C po dobu 10 minút. Vzorky boli ponechané v tme až do vychladnutia. Po vychladnutí boli doplnené destilovanou vodou na objem 10 ml a premiešané vortexom. Tieto vzorky boli zanalyzované na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 540 nm. Každá vzorka bola trikrát premeraná a zo získaných hodnôt absorbancií bol pomocou softvéru Microsoft Excel vypočítaný ich priemer a následne aj koncentrácia z rovnice kalibračnej krivky.

3.3.9.2 Príprava kalibračnej krivky

Pre stanovenie kalibračnej krivky bol pripravený roztok glukózy o koncentrácii 4 g/l a do skúmaviek bolo napipetované 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 a 3,5 ml tohto roztoku a doplnené na objem 4 ml destilovanou vodou. Bolo odpipetované 0,5 ml týchto roztokov a k nim pridané 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Skúmavky boli inkubované v 70 °C vodnom kúpeli po dobu 10 minút, vychladnuté v tme, doplnené na objem 10 ml a premiešané vortexom. Absorbancia bola trikrát premeraná pri vlnovej dĺžke 540 nm.

3.3.10 Určenie koncentrácie PMA iónovo výmennou chromatografiou IEC

U vzoriek supernatantov získaných z jednotlivých kultivácií bola po hydrolýze analyzovaná koncentrácia kyseliny jablčnej pomocou IEC za použitia vodivostného detektoru a kolóny na organické kyseliny. Na kalibráciu bol použitý štandard kyseliny jablčnej o koncentrácii 100 ppm. Mobilnou fázou bola 0,25 mM HClO₄ s prietokom 0,5 ml/min. Analýza prebiehala 32 minút pri teplote termostatu 30 °C. PMA produkcia bola reportovaná ako jablčná kyselina získaná po hydrolýze PMA s 2 M H₂SO₄.

3.3.10.1 Príprava hydrolyzovaných vzoriek

Do sklenených vialiek bolo pipetované 2 ml supernatantu a pridané 2 ml 2 M kyseliny sírovej. Vialky boli uzavreté, premiešané a obsah bol hydrolyzovaný 24 hodín pri teplote 90 °C. Po hydrolýze bolo upravované pH na hodnotu 3-8 prostredníctvom 2 M roztoku hydroxidu sodného. Neutralizované vzorky boli doplnené na objem 10 ml destilovanou vodou, následne boli centrifugované. Po odstránení nežiadúcich zrazenín z roztokov boli vzorky 10x zriedené. Takto pripravené vzorky boli použité na analýzu koncentrácie PMA.

3.4 Kultivácia mikroorganizmu *Bacillus licheniformis*

3.4.1 Tuhé uchovávacie médium

Na dlhodobé uchovanie kultúry bolo použité vopred vysterilizované NB médium o koncentrácii 25 g/l destilovanej vody a agaru o koncentrácii 20 g/l a médium uvedené v Tabuľka 4. Kultúra mikroorganizmu *Bacillus licheniformis* bola kultivovaná 24 hodín na temperovanej trepačke o teplote 37 °C a následne uchovaná na agarových platniach v tme pri 4 °C.

Tabuľka 4 Tuhé uchovávacie médium

zlúčenina	koncentrácia (g/l)
pepton	5
beef extract	3
MnSO ₄ .2 H ₂ O	0,01
agar	20

3.4.2 Príprava inokula

Zloženie inokula bolo rovnaké ako pri príprave tuhých uchovávacích médií (Tabuľka 4), avšak bez prídavku agaru. Kultúra *Bacillus licheniformis* bola zaočkovaná z Petriho misky do 100 ml Erlenmayerovej banky s 50 ml objemom sterilného média. Kultivácia inokula prebiehala za stáleho trepania pri teplote 37 °C, 180 rpm v priebehu 16 hodín. Toto inokulum bolo na ďalší deň použité na zaočkovanie produkčného média.

3.4.3 Príprava produkčného média

Na základe štúdia literatúry boli pre kultiváciu baktérie *Bacillus licheniformis* vybrané dve produkčné médiá. Experimentálne sa neosvedčilo E médium (Tabuľka 6), ktoré je v odbornej literatúre [25; 36] veľmi často využívané na produkciu polyméru kyseliny glutámovej. Po sterilizácii 50 ml produkčného média v 100 ml Erlenmayerových bankách pri 121 °C po dobu 20 minút bolo toto médium zaočkované v laminárnom boxe inokulom o objeme 10 obj. %. Banka bola umiestnená na temperovanú trepačku s teplotou 37 °C a rýchlosťou 180 rpm na 72 hodín.

Tabuľka 5 Produkčné médium

zlúčenina	koncentrácia (g/l)
glutamát sodný	20
glukóza	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
Na ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,50
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,02
FeCl ₃ .7 H ₂ O	0,05

Tabuľka 6 E médium

zlúčenina	koncentrácia (g/l)
glutamát sodný	20
kyselina citrónová	12
glycerol	80
NH ₄ Cl	7
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
MnSO ₄ .H ₂ O	0,104
CaCl ₂ .H ₂ O	0,15
FeCl ₃ .7H ₂ O	0,04

3.4.4 Štúdium vplyvu pH na biosyntézu PGA

Bol uskutočnený experiment s cieľom preskúmať vplyv rôznych koncentrácií (NH₄)₂SO₄ na produkciu polyméru kyseliny glutámovej. Produkčné médium (Tabuľka 5) bolo pripravené s rôznymi koncentraciami síranu amónneho (1, 3, 5 a 10 g/l), následne zaočkované inokulom a vložené do temperovanej trepačky s 180 rpm a teplotou 37 °C. Kultivácia bola ukončená po 72 hodinách. Bola stanovená biomasa a tiež obsah polyglutámovej kyseliny, gravimetricky a spektrofotometricky.

3.4.5 Použitie odpadových substrátov v produkcii PGA

Prebehla štúdia produkcie polyméru kyseliny glutámovej s použitím odpadových substrátov, konkrétne nehydrolyzovanej srvátky a hydrolyzovaného peria. Do Erlenmayerových baniek boli navážené zložky produkčného média (Tabuľka 5). Do prvej banky bolo pridané 10 obj. % srvátky, do druhej 10 obj. % peria a tretia banka bola kontrolná – bez prídavku odpadového substrátu. Objem baniek bol doplnený na 50 ml, zaočkovaný inokulom pripraveným predchádzajúci deň. Experiment prebiehal 72 hodín na temperovanej trepačke s 37 °C a 180 rpm. Bola stanovená koncentrácia biomasy a polyméru kyseliny glutámovej.

3.4.6 Analýza biomasy

Biomasa bola analyzovaná gravimetricky hneď po ukončení kultivácie. Postup bol uskutočnený rovnakým spôsobom, aký je popísaný v bode 3.3.7.

3.4.7 Stanovenie koncentrácie PGA gravimetricky

Získaný supernatant po scentrifugovaní kultúry po inkubácii bol použitý na gravimetrické stanovenie koncentrácie polyméru glutámovej kyseliny. 3 objemy vychladeného etanolu boli pridané k jednému objemu supernatantu. Ihneď po prídavku etanolu bol viditeľný vláknitý precipitát polyglutámovej kyseliny. Zmes bola uchovaná 24 hodín pri 4 °C v chladničke a následne centrifugovaná pri 6 000 rpm po dobu 10 minút. Etanol bol odliaty a zrazenina usušená v sušiarňi pri teplote 75 °C, zvážená a prepočítaná na jednotku koncentrácie g/l.

3.4.8 Stanovenie koncentrácie PGA spektrofotometricky

Koncentrácia polyméru kyseliny glutámovej bola meraná pomocou spektrofotometrickej metódy s využitím zlúčeniny cetyltrimetylamónium bromid (CTAB). V tejto metóde sa CTAB viaže špecificky ku γ -PGA za tvorby vo vode nerozpustného, vysoko dispergovaného micelárneho komplexu, čo vedie k zakaleniu suspenzie [37].

3.4.8.1 Príprava roztokov a vzoriek

Na analýzu bol používaný 0,07 M roztok CTAB v 2 % hydroxide sodnom. Na prípravu tohto roztoku bolo navážené 0,51 g CTAB a 0,4 g NaOH zmiešaného s 20 ml destilovanej vody. Po prídavku hydroxidu sodného k CTAB sa zmes podrobila ultrazvuku na dispergáciu gélovitých molekúl CTAB.

Supernatant bol použitý ako vzorka na určenie koncentrácie polyméru kyseliny glutámovej. γ -PGA bola vyzrážaná pridaním dostatočne chladeného bezvodého etanolu. K jednému objemu supernatantu boli pridané tri objemy etanolu. Zmes bola držaná pri teplote 4 °C 24 hodín. γ -PGA bola oddelená centrifúgou pri 12 000 rpm po dobu 20 minút. Etanol bol odliaty, polymér zmiešaný s 2 ml vody a rozpustený vortexom. Na mikrotitračnú dosičku bolo odpipetovaných 100 μ l vzorky a zmiešaných so 100 μ l CTAB roztoku. Po uplynutí troch minút bola koncentrácia polyméru kyseliny glutámovej stanovená meraním zákalu pri 405 nm oproti slepému vzorku (100 μ l destilovanej vody a 100 μ l roztoku CTAB) a porovnaná s kalibračnou krivkou pripravenou použitím čistého polyméru kyseliny glutámovej v softvéri Microsoft Excel.

3.4.8.2 Príprava kalibračnej krivky

Kalibračná krivka bola zostrojená premeraním roztokov štandardu polyméru kyseliny glutámovej o koncentrácii 10-100 μ g/ml. Na jej získanie bol pripravený zásobný roztok

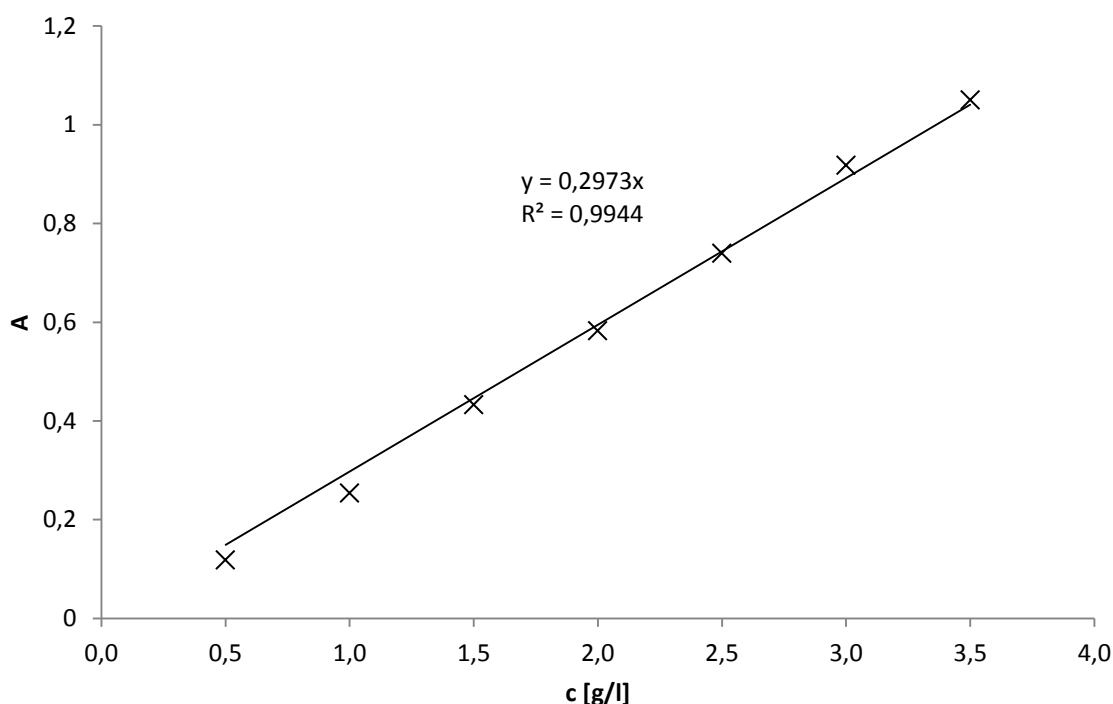
polyméru kyseliny glutámovej o koncentrácii 1 mg/ml. Z tohto zásobného roztoku bolo do 2 ml Eppendorf skúmaviek napipetované 10, 20, 50, 75, 100 μ l a doplnené na objem 1 ml destilovanou vodou. Eppendorf skúmavky boli zvortexované na vytvorenie homogénnych roztokov. Z týchto skúmaviek bolo ďalej pipetované 100 μ l na mikrotitračnú doštičku a pridaný ten istý objem CTAB roztoku. Po 3 minútach reakcie pri laboratórnej teplote bola zmeraná absorbanca pomocou prístroja ELISA pri 405 nm.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Kalibrácia metód

4.1.1 Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny

Hodnoty pre kalibračnú krivku vyjadrujúcu lineárnu závislosť medzi absorbanciou a známymi koncentráciami glukózy boli získané podľa postupu v kapitole 3.3.9.2.

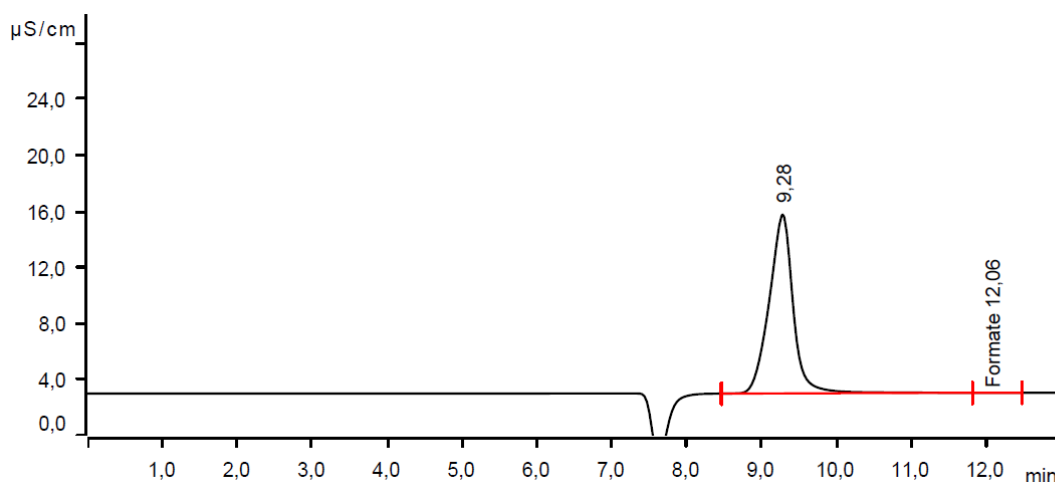


Graf 1 Kalibračná krivka na stanovenie redukujúcich sacharidov pri 540 nm

Z tejto kalibračnej krivky bola určená kalibračná závislosť $y = 0,2973x$ s regresným koeficientom $R^2 = 0,9944$, z ktorej bola určovaná koncentrácia zvyškovej glukózy vo vzorkách.

4.1.2 Určenie koncentrácie PMA iónovo výmennou chromatografiou IEC

Pomocou iónovo výmennej chromatografie bol analyzovaný štandard kyseliny jablčnej o koncentrácii 100 ppm. Chromatogram vyjadruje závislosť medzi retenčným časom na osi x a výškou pík na osi y.

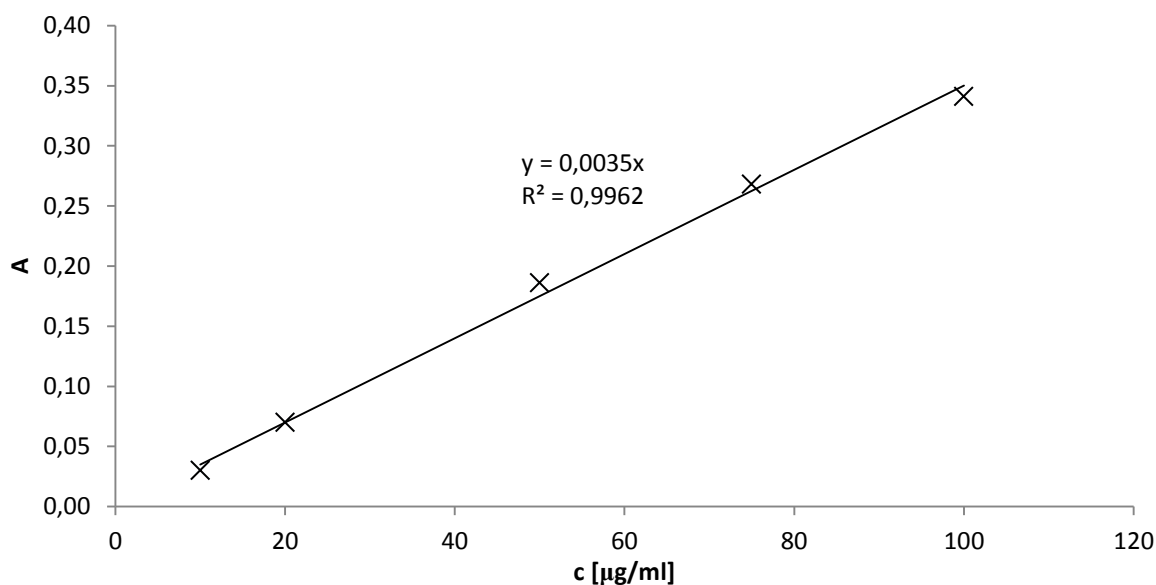


Graf 2 Chromatogram kyseliny jablčnej o koncentrácii 100 ppm

Vrchol píku na vizuálnom výstupe z chromatografu s retenčným časom 9,280 minút zodpovedá kyseline jablčnej. Výška tohto píku je 12,725 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Integráciou píku bola zistená jeho plocha s hodnotou 4,738 5 ($\mu\text{S}/\text{cm}$) x min, pomocou ktorej bola vypočítaná koncentrácia jablčnej kyseliny vo vzorkách, a to porovnávaním plôch píkov vzorkov (priamou úmerou), s prihliadnutím na riedenie vzorkov.

4.1.3 Stanovenie koncentrácie PGA spektrofotometricky

Dáta pre stanovenie kalibračnej krivky boli získané spektrofotometrickým meraním koncentrácií štandardu polyméru kyseliny glutámovej pri vlnovej dĺžke 405 nm.



Graf 3 Kalibračná krivka na stanovenie koncentrácie PGA pri 405 nm

Z kalibračnej krivky bola zistená rovnica regresnej priamky $y = 0,0035x$ s regresným koeficientom $R^2 = 0,9962$. Táto kalibračná závislosť následne poslúžila na určenie polyméru glutámovej kyseliny vo vzorkách.

4.2 Kultivácia kmeňov *Aureobasidium pullulans*

4.2.1 Štúdium efektov počiatočnej koncentrácie glukózy na produkciu PMA

Bol študovaný efekt počiatočnej koncentrácie glukózy v kultivačnom médiu na produkciu PMA a rast buniek. Jablčná kyselina je intermediát v Krebsovom cykle a jej produkcia, ktorá je predpokladom biosyntézy PMA, vyžaduje nadmerné zásobovanie glukózou. Vysoká koncentrácia glukózy preto napomáha PMA produkcii [38].

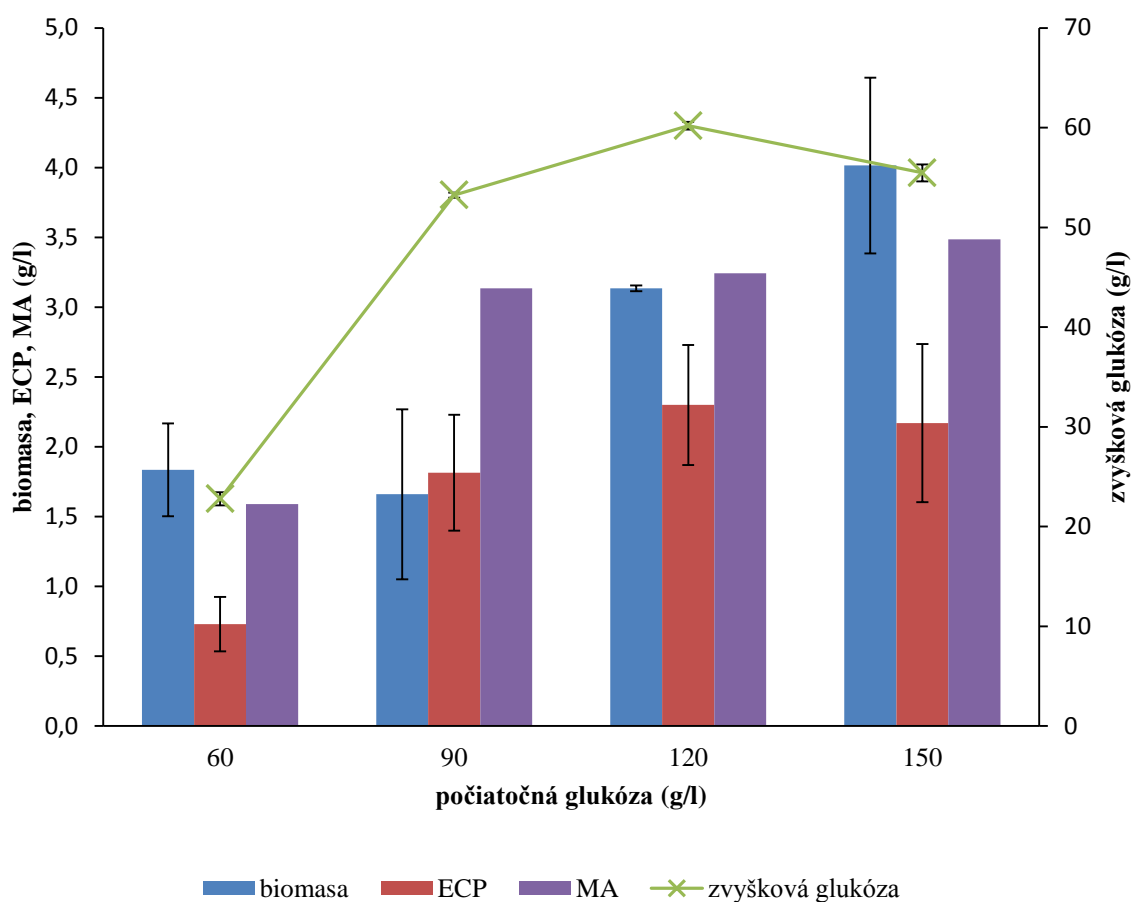
Boli stanovované koncentrácie biomasy a extracelulárnych produktov ako zmes polyméru kyseliny jablčnej a pullulanu. Ďalším stanovením bola koncentrácia zvyškovej glukózy, resp. nevyužitej počiatočnej glukózy pri fermentačnom procese. Poslednou hodnotou je množstvo hydrolyzovaného PMA.

V prvom experimente boli študované koncentrácie 60, 90, 120 a 150 g/l glukózy a prídavku CaCO_3 o koncentrácii 30 g/l na udržanie neutrálneho pH. Ako je z uvedených výsledkov (Tabuľka 7) zjavné, PMA produkcia sa zreteľne navýšila po navýšení koncentrácie glukózy z 60 na 90 g/l vo fermentačnom médiu. Avšak po ďalších prídavkoch glukózy sa už výrazne koncentrácia PMA nemenila. Najvyššia koncentrácia MA s hodnotou 3,487 g/l bola nameraná pomocou IC pri 150 g/l glukózy. Pri tejto koncentrácii glukózy bol viditeľný nárast bunkovej biomasy, avšak nižšie množstvo extracelulárnych produktov oproti 120 g/l, glukóza bola teda využitá hlavne na rast buniek.

Za optimálnu koncentráciu glukózy pre produkciu PMA bola zvolená koncentrácia 90 g/l, kedy bola v porovnaní s počiatočnou glukózou produkcia PMA najvyššia.

Tabuľka 7 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* CCM 8182, experiment 1

počiatočná glukóza (g/l)	biomasa (g/l)	extracelulárne produkty (g/l)	zvyšková glukóza (g/l)	jablčná kyselina (g/l)
60	1,835 ± 0,332	0,730 ± 0,195	22,783 ± 0,651	1,5892
90	1,660 ± 0,608	1,815 ± 0,415	53,235 ± 0,252	3,1358
120	3,135 ± 0,021	2,300 ± 0,430	60,197 ± 0,398	3,2430
150	4,015 ± 0,629	2,170 ± 0,566	55,466 ± 0,846	3,4870

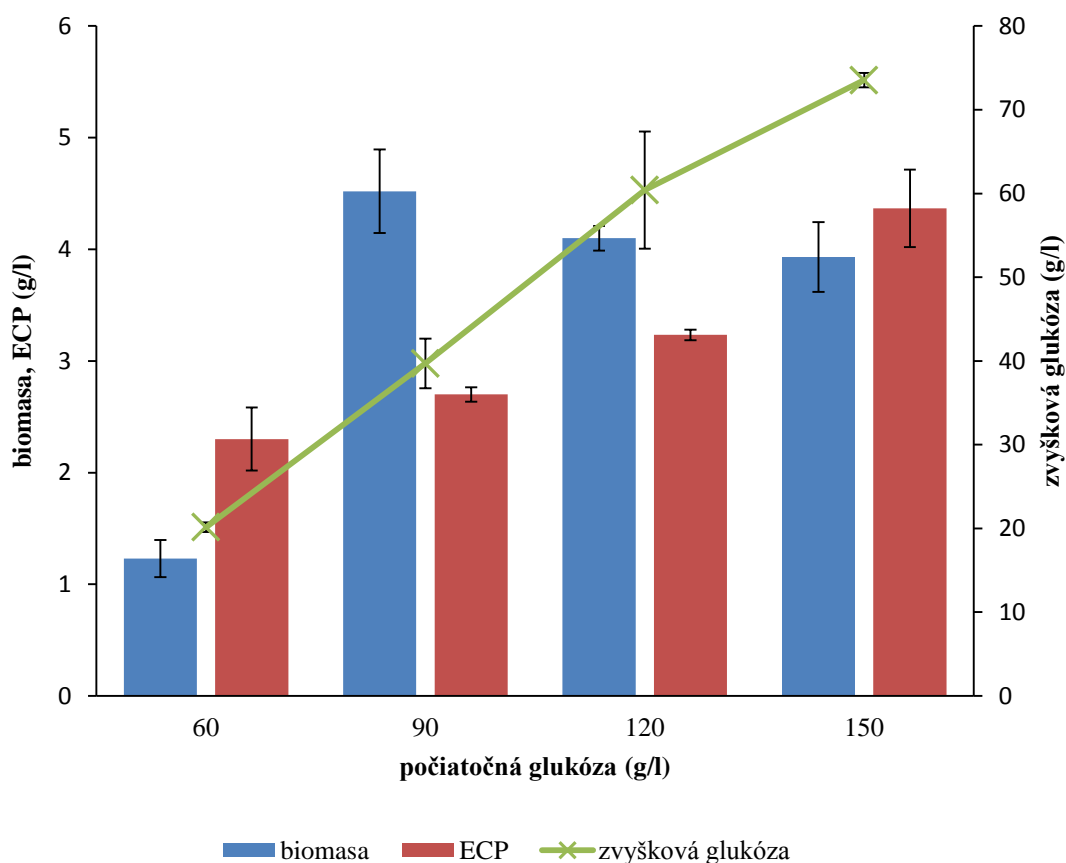


Graf 4 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* CCM 8182, experiment 1

Pri druhom experimente sa vynechalo použitie CaCO_3 v produkčnom médiu a boli použité rovnaké koncentrácie glukózy a ten istý kmeň *Aureobasidium pullulans* CCM 8182, tak ako pri prvom experimente. Výsledky sú však rozdielne. Pri 90 g/l glukózy bola nameraná najvyššia koncentrácia bunkovej biomasy, ktorá sa so zvyšujúcou koncentráciou glukózy znižovala. Koncentrácia extracelulárnych polymérov narastala takmer lineárne so zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy. Pri tomto experimente bola pozorovaná vyššia koncentrácia extracelulárnych polymérov, avšak nepodarilo sa zanalyzovať kyselinu jablčnú. To mohlo byť zapríčinené nepoužitím neutralizujúceho uhličitanu vápenatého. Nižšie pH mohlo spôsobiť hydrolýzu PMA (pri $\text{pH} < 5$) a indukovať produkciu extracelulárneho polysacharidu, pullulanu ($\text{pH} 4,5$) a chlamydospór ($\text{pH} 3$) [38].

Tabuľka 8 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* CCM 8182, experiment 2

počiatočná glukóza (g/l)	biomasa (g/l)	extracelulárne produkty (g/l)	zvyšková glukóza (g/l)	jablčná kyselina (g/l)
60	1,230 ± 0,167	2,300 ± 0,282	20,153 ± 0,582	
90	4,520 ± 0,373	2,700 ± 0,064	39,713 ± 2,965	
120	4,100 ± 0,110	3,233 ± 0,047	60,410 ± 6,992	
150	3,930 ± 0,313	4,366 ± 0,346	73,540 ± 0,857	



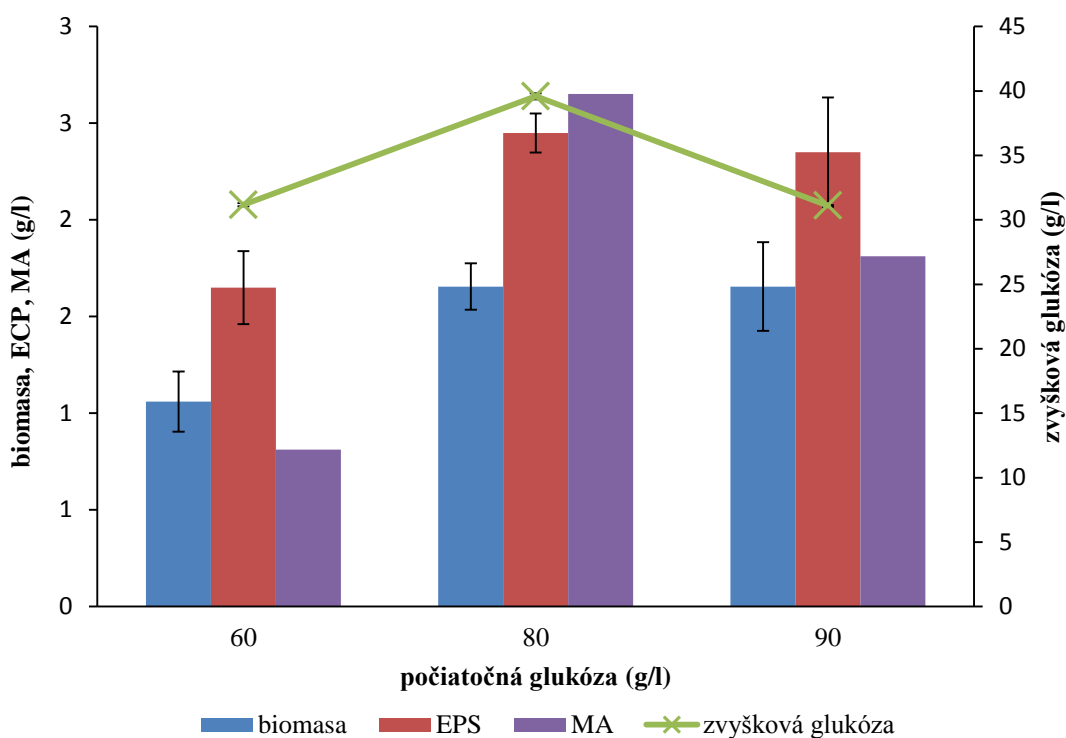
Graf 5 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* CCM 8182, experiment 2

Tretí experiment štúdia efektu počiatočnej koncentrácie glukózy na rast buniek a biosyntézu PMA bol realizovaný s kmeňom *Aureobasidium pullulans* DSM 3497. Boli zvolené koncentrácie 60, 80 a 90 g/l glukózy v produkčnom médiu I (Tabuľka 2). S vyššími koncentraciami sa nepracovalo kvôli výsledkom z experimentu 1 (Tabuľka 7), kedy sa koncentrácia PMA pri 120 a 150 g/l oproti 90 g/l už výrazne nemenila. Aj napriek nepoužívaniu neutralizačnej zlúčeniny CaCO_3 sa podarilo vyprodukovať polyjablčnú kyselinu. Najvýhodnejšia koncentrácia zdroja uhlíka sa môže líšiť v závislosti od kmeňa

mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans*. *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 poskytoval najvyššie hodnoty jablčnej kyseliny pri 80 g/l glukózy, hodnoty koncentrácie biomasy a extracelulárnych produktov boli takmer zhodné s výsledkami získanými kultiváciou s koncentráciou glukózy 90 g/l. Pri všetkých troch experimentoch boli pri použití 60 g/l glukózy zaznamenané najnižšie koncentrácie biomasy, extracelulárnych produktov a jablčnej kyseliny.

Tabuľka 9 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* DSM 3497, experiment 3

počiatočná glukóza (g/l)	biomasa (g/l)	extracelulárne produkty (g/l)	zvyšková glukóza (g/l)	jablčná kyselina (g/l)
60	1,060 ± 0,156	1,650 ± 0,189	31,174 ± 0,127	0,812
80	1,655 ± 0,120	2,450 ± 0,101	39,586 ± 0,235	2,651
90	1,655 ± 0,229	2,350 ± 0,283	31,111 ± 0,019	1,812



Graf 6 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* DSM 3497, experiment 3

4.2.2 Štúdium efektu rôznych suplementov na bunkový rast a produkciu PMA

Tento experiment bol uskutočnený pri konštantnej koncentrácii glukózy 60 g/l s mikroorganizmom *Aureobasidium pullulans* DSM 3497. V prvej Erlenmayerovej banke bola testovaná laktóza ako zdroj uhlíka. Bol sledovaný vplyv na rast a produkciu PMA

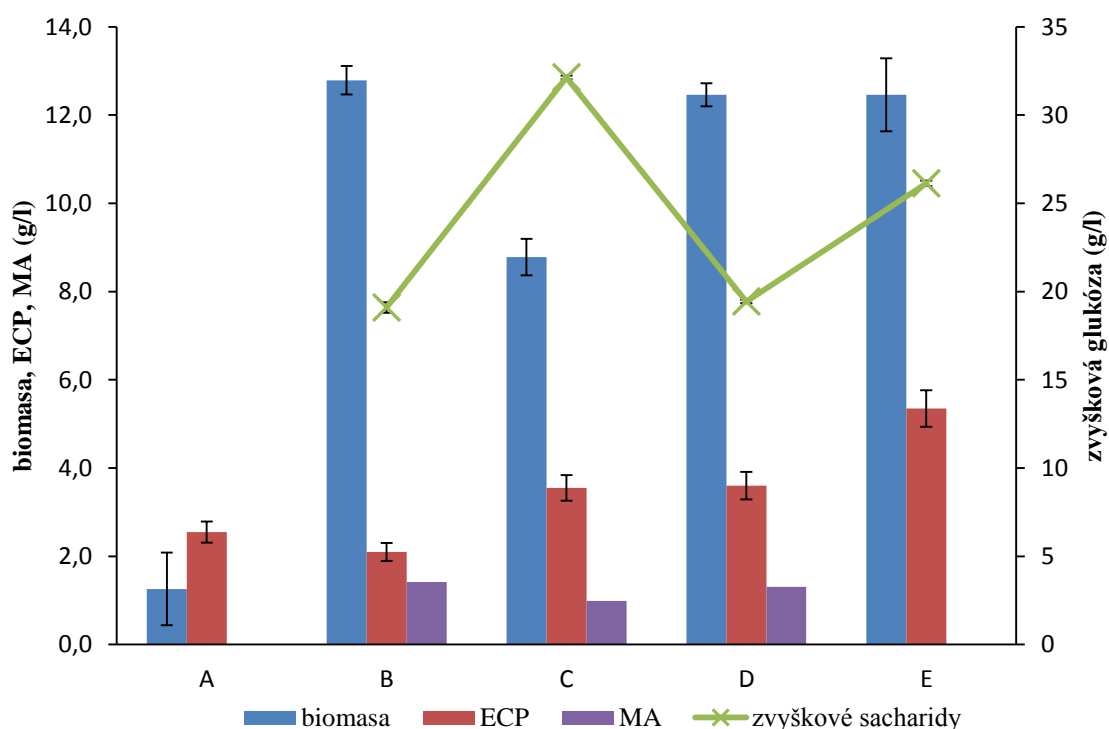
prídavkom CaCO_3 s 30 g/l a kyseliny fumarovej o koncentrácii 3 g/l, a tiež zámena dusíkatého zdroja NaNO_3 za dusičnan amónny [9]. V poslednej Erlenmayerovej banke bolo použité produkčné médium II (Tabuľka 3) s iným zložením ako klasicky používané produkčné médium.

Boli určené a tiež graficky spracované obsahy bunkovej biomasy, extracelulárnych produktov, zvyškovej glukózy a jablčnej kyseliny.

Použitie dvoch inokúl malo výrazne pozitívny efekt na rast biomasy, boli dosiahnuté jej niekoľkonásobne vyššie výťažky. Zvýšila sa tiež koncentrácia extracelulárnych produktov oproti predchádzajúcim experimentom so 60 g/l glukózy v produkčnom médiu. Produkčné médium s uhličitanom vápenatým malo pozitívny efekt na produkciu polyméru kyseliny jablčnej a tiež biomasy. Pri využití laktózy o koncentrácii 60 g/l sme zaznamenali najnižšiu koncentráciu biomasy. Niektoré kmene mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans* nemajú schopnosť utilizovať laktózu ako zdroj uhlíka pre produkciu ECP [39]. Na experiment použitý kmeň *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 asimiloval laktózu a využil ju pravdepodobne len na produkciu pullulanu. Prídavok kyseliny fumarovej, prekursor kyseliny jablčnej, ukázal zníženú hodnotu biomasy. Na rozdiel od výsledkov prezentovaných vo vedeckom článku, nepodporil tento suplement tvorbu PMA [9]. Použitím dusičnanu amónneho ako náhrady za dusičnan sodný došlo k produkcii biomasy a PMA o veľmi podobných výťažkoch ako v experimente s uhličitanom vápenatým. Najvyšších výťažkov ECP bolo dosiahnutých použitím produkčného média II. Z výsledkov (Tabuľka 10) vyplýva, že použité médium stimulovalo pravdepodobne len syntézu pullulanu, pretože sa nepodarilo analyzovať jablčnú kyselinu. Porovnaním výsledkov s Tabuľka 9 pri koncentrácii 60 g/l glukózy bola po pridaní uhličitanu vápenatého a zámene dusičnanu sodného za dusičnan amónny zistená vyššia koncentrácia jablčnej kyseliny. Týmto prídavkom možno priradiť pozitívny vplyv na PMA produkciu.

Tabuľka 10 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* DSM 3497

	podmienky kultivácie	biomasa (g/l)	extracelulárne produkty (g/l)	zvyšková glukóza (g/l)	jablčná kyselina (g/l)
A	laktóza	$1,260 \pm 0,822$	$2,550 \pm 0,241$		
B	uhličitan vápenatý	$12,790 \pm 0,322$	$2,100 \pm 0,204$	$19,105 \pm 0,299$	1,418
C	kyselina fumarová	$8,780 \pm 0,415$	$3,550 \pm 0,291$	$32,134 \pm 0,108$	0,990
D	dusičnan amónny	$12,460 \pm 0,258$	$3,600 \pm 0,312$	$19,442 \pm 0,101$	1,306
E	produkčné médium II	$12,460 \pm 0,824$	$5,350 \pm 0,412$	$26,135 \pm 0,154$	



Graf 7 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* DSM 3497

4.2.3 Použitie srvátky a peria – odpadových substrátov v produkcii PMA

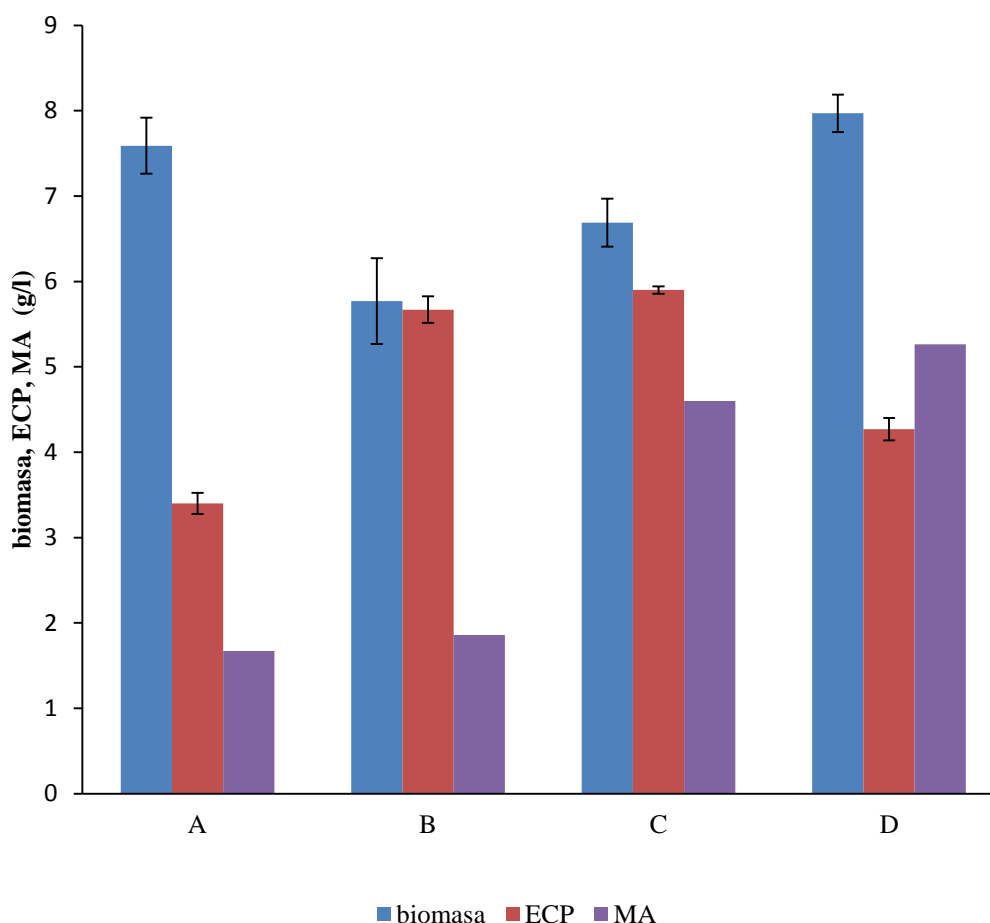
V tejto štúdii boli využívané odpadové substráty, ktoré by mohli znížiť náklady na produkciu PMA. Bola využívaná srvátka, ktorej hlavným komponentom je sacharid laktóza. Srvátka je tiež pomerne dobrým zdrojom bielkovín, ako bolo uvedené v kapitole 2.2.1. Hydrolyzované perie poskytovalo zdroj dusíka vo forme aminokyselín (kapitola 2.2.2). Po ukončení experimentu boli analyzované koncentrácie biomasy, extracelulárnych produktov a jablčnej kyseliny. Zvyškové sacharidy nebolo možné určiť pomocou spektrofotometrie, nakoľko sa touto metódou nedal stanoviť pomer laktózy a glukózy v produkčnom médiu.

V experimente 1 sa využívala proteázou hydrolyzovaná srvátka a kmeň *Aureobasidium pullulans* CCM 8182. Boli pripravené produkčné média obsahujúce 100 obj. % srvátky, 50 obj. % srvátky s prídavkom 40 g/l glukózy a 10 obj. % srvátky s 90 g/l glukózy. Kontrolná Erlenmayerová banka obsahovala 90 g/l glukózy. Kultivácia s využitím 100 obj. % srvátky nebola z hľadiska produkcie PMA úspešná, avšak došlo k zisku relatívne vysokých kocentrácii biomasy (Tabuľka 11). Koncentrácia biomasy dosahovala veľmi podobných hodnôt ako v prípade kontrolnej kultivácie s glukózou (90 g/l). V produkčnom médiu obsahujúcom 50 obj. % srvátky bola nameraná vyššia koncentrácia MA a extracelulárnych polymérov, ale nižšia bunková biomasa ako pri 100 obj. % srvátke. Pri

prídavku 10 obj. % srvátky k 90 g/l glukózy nebol zaznamenaný nárast koncentrácie PMA a biomasy, len nárast extracelulárnych polymérov v porovnaní s kontrolnou bankou. Najvyššia koncentrácia MA a biomasy bola zaznamenaná v kontrolnej banke.

Tabuľka 11 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* CCM 8182, experiment 1

	podmienky kultivácie	biomasa (g/l)	extracelulárne produkty (g/l)	jablčná kyselina (g/l)
A	100 % srvátka	7,590 ± 0,328	3,400 ± 0,122	1,6722
B	50 % srvátka + 40 g/l glukóza	5,770 ± 0,501	5,670 ± 0,156	1,8600
C	10 % srvátka + 90 g/l glukóza	6,690 ± 0,281	5,900 ± 0,043	4,5985
D	kontrola 90 g/l glukóza	7,970 ± 0,220	4,270 ± 0,131	5,2636



Graf 8 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* CCM 8182, experiment 1

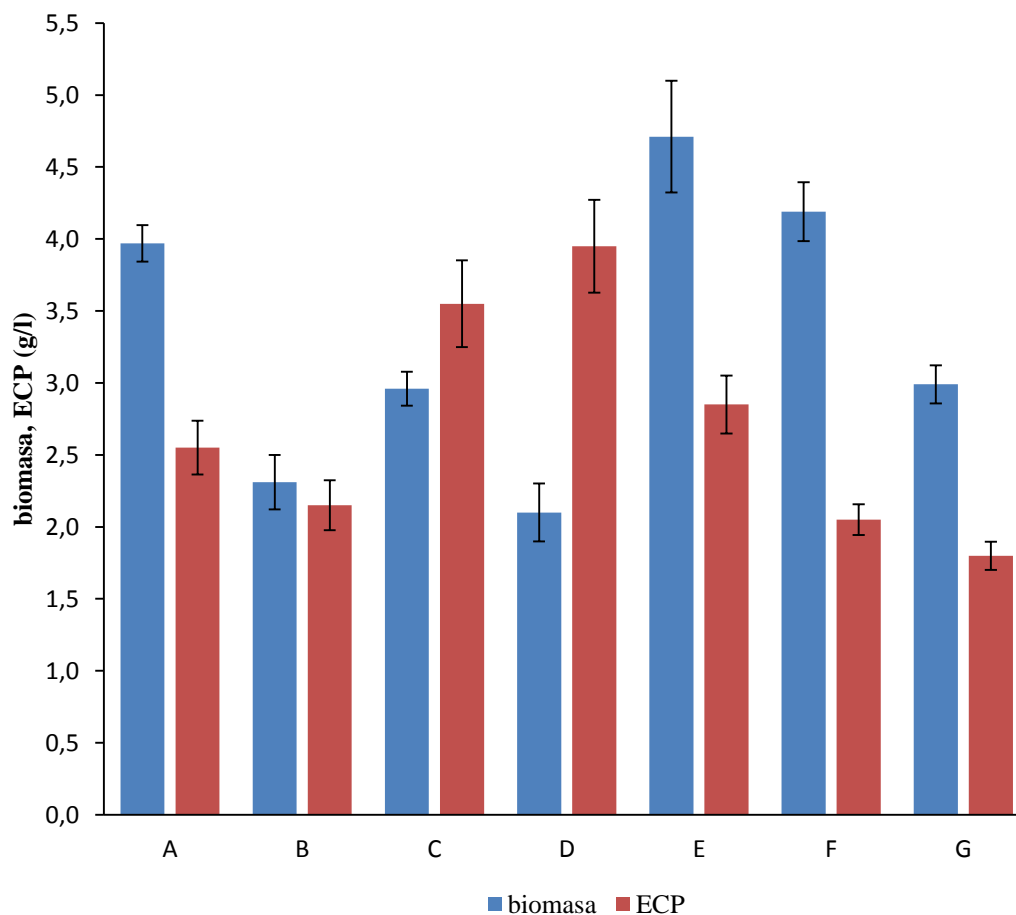
Druhý experiment s odpadovými substrátmi bol vykonaný s *Aureobasidium pullulans* DSM 3497. Bolo použité produkčné médium I s prídavkom yeast extraktu o koncentrácii 3 g/l. Aplikovaná bola nehydrolyzovaná srvátka a chemicky hydrolyzované perie. Koncentrácie srvátky a glukózy boli rovnaké ako pri experimente 1. Pri prídavku dusíkatého odpadového zdroja sa používalo 10 obj. % peria s 90 g/l glukózy bez a s použitím yeast extraktu.

Bola stanovená koncentrácia biomasy a extracelulárnych polymérov, koncentráciu MA nebolo pomocou iónovo výmennej chromatografie možné určiť.

Najvyššia hodnota biomasy bola opäť zaznamenaná pri kontrole s 90 g/l glukózy bez využitia odpadového substrátu, za ňou nasledovalo produkčné médium s 10 obj. % peria s yeast extraktom a 100 obj. % srvátky. Pri použití 10 obj. % srvátky s yeast extraktom bola získaná nižšia koncentrácia biomasy, avšak vyššia koncentrácia extracelulárnych produktov v porovnaní s 10 obj. % srvátky bez yeast extraktu. Pri aplikácii peria bola evidovaná vyššia biosyntéza extracelulárnych polymérov a rast buniek pri prídavku yeast extraktu, pretože perie má ako zdroj komplexného dusíka pozitívny vplyv na rast biomasy. Najnižšia koncentrácia biomasy bola pozorovaná pri 10 obj. % srvátky a najnižšie extracelulárne polyméry vyzrážané etanolom boli získané pri 10 obj. % peria bez použitia yeast extraktu.

Tabuľka 12 Výsledky stanovení pre kmeň *A. pullulans* DSM 3497, experiment 2

	podmienky kultivácie	biomasa (g/l)	extracelulárne produkty (g/l)	jablčná kyselina (g/l)
A	100% srvátka	3,970 ± 0,127	2,550 ± 0,187	
B	50% srvátka + 40g/l glukóza	2,310 ± 0,189	2,150 ± 0,174	
C	10% srvátka + 90 g/l glukózy; bez yeast extrakt	2,960 ± 0,118	3,550 ± 0,301	
D	10% srvátka + 90 g/l glukóza	2,100 ± 0,201	3,950 ± 0,322	
E	kontrola 90 g/l glukóza	4,710 ± 0,388	2,850 ± 0,202	
F	10% perie + 90 g/ glukóza	4,190 ± 0,204	2,050 ± 0,107	
G	10% perie + 90 g/l glukózy; bez yeast extrakt	2,990 ± 0,133	1,800 ± 0,098	



Graf 9 Výsledky stanovení pro kmeň *A. pullulans* DSM 3497, experiment 2

4.3 Kultivácia mikroorganizmu *Bacillus licheniformis*

4.3.1 Štúdium vplyvu pH na biosyntézu PGA

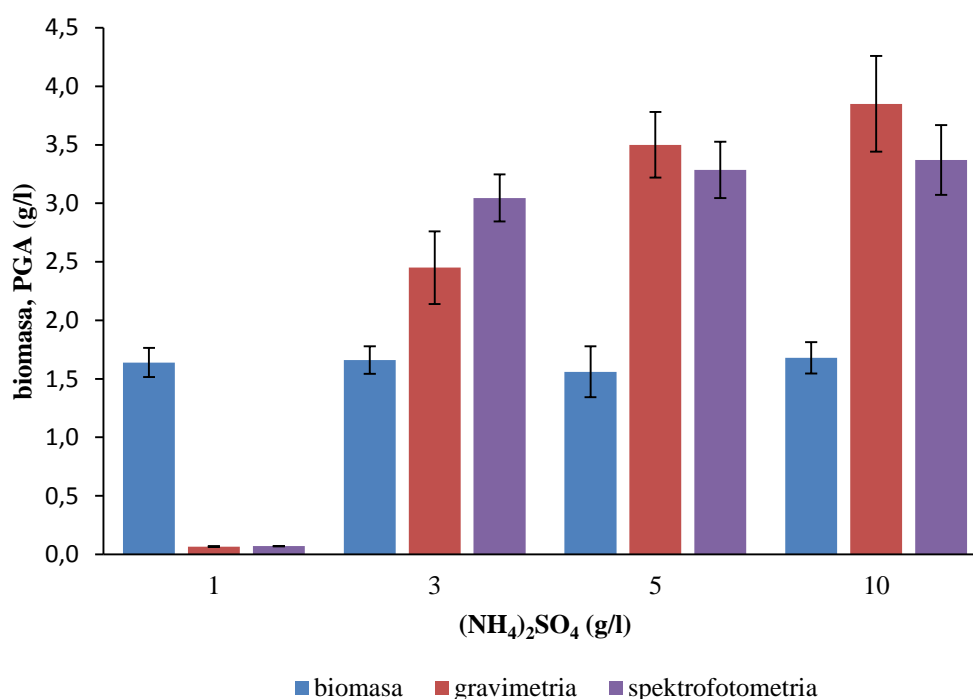
Bol študovaný efekt koncentrácie síranu amónneho na syntézu PGA mikroorganizmom *Bacillus licheniformis*. Boli aplikované rôzne koncentrácie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1, 3, 5 a 10 g/l). Po ukončení experimentu bola zisťovaná koncentrácia biomasy a PGA pomocou gravimetrie a spektrofotometrie.

Výsledky ukázali, že prídavok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nemal vplyv na bunkový rast, hodnoty bunkovej biomasy sú u všetkých koncentrácií síranu amónneho približne zhodné. Zvyšovanie koncentrácie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ovplyvnilo zvyšovanie koncentrácie PGA produktu. Prídavkom síranu amónneho došlo k zníženiu pH produkčného média, bol ním poskytnutý tiež zdroj dusíka vo forme amónneho kationu. V prípade, kedy bolo do kultivačného média pridaných 10 g/l síranu amónneho, bola nameraná najvyššia koncentrácia PGA gravimetricky a tiež

spektrofotometricky (Tabuľka 13). Táto koncentrácia je teda považovaná ako optimálna z hľadiska produkcie PGA, preto bola použitá aj v ďalšom experimente.

Tabuľka 13 Výsledky stanovení pre kmeň *B. licheniformis* CCM 2206

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	biomasa (g/l)	polymér kyseliny glutámovej (g/l) gravimetricky	polymér kyseliny glutámovej (g/l) spektrofotometricky
1	1,640 ± 0,124	0,067 ± 0,004	0,070 ± 0,002
3	1,660 ± 0,117	2,450 ± 0,310	3,046 ± 0,201
5	1,560 ± 0,218	3,500 ± 0,281	3,286 ± 0,241
10	1,680 ± 0,134	3,850 ± 0,410	3,371 ± 0,298



Graf 10 Výsledky stanovení pre kmeň *B. licheniformis* CCM 2206

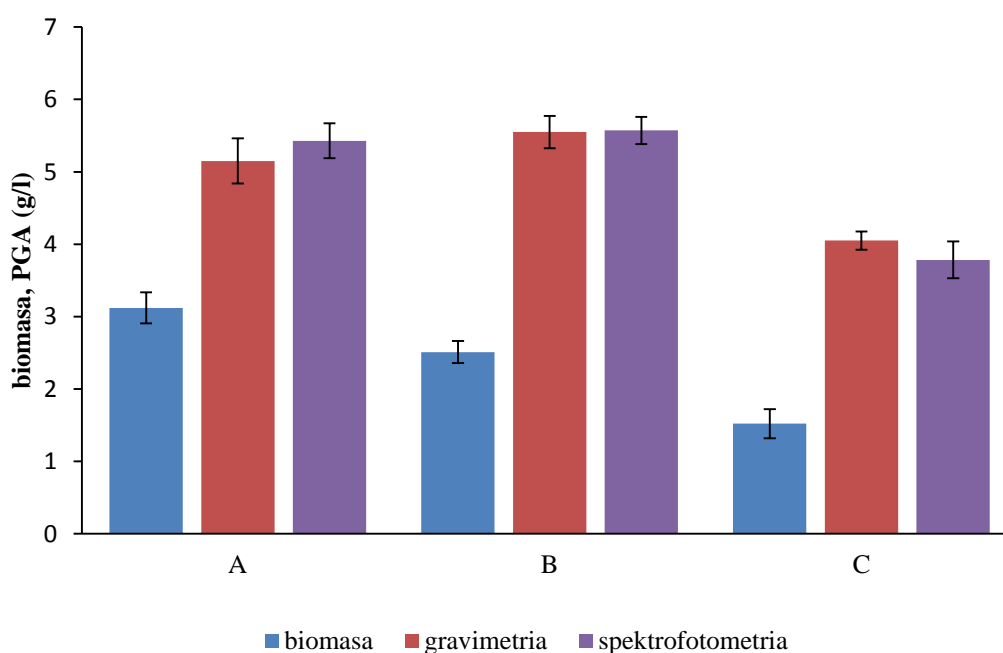
4.3.2 Použitie odpadových substrátov v produkcii PGA

V tomto experimente bola PGA produkovaná v kultivačnom médiu obsahujúcom prídavok 10 obj. % nehydrolyzovanej srvátky a 10 obj. % alkalicky hydrolyzovaného peria. Po ukončení kultivácie boli zisťované koncentrácie bunkovej biomasy. Koncentrácie PGA boli určené vyzrážaním etanolom a tiež spektrofotometrickou metódou.

Podľa uvedených výsledkov (Tabuľka 14) je možné použitie odpadových substrátov zhodnotiť pozitívne z hľadiska výťažkov biomasy a PGA. Po prídavku odpadových substrátov bol zaznamenaný nárast koncentrácie biomasy a tiež PGA oproti kontrole. Najvyššia koncentrácia PGA bola zmeraná po prídavku hydrolyzovaného peria, ktoré poskytlo zdroj dusíka vo forme aminokyselín, ktorý je dôležitý pre syntézu PGA, dusík obsahujúceho biopolyméru [40]. Ako bolo spomínané v 2.4.4.1, mikroorganizmus *Bacillus licheniformis* produkuje proteázy, ktoré mohli spôsobiť štiepenie peptidickej väzby proteínov v nehydrolyzovanej srvátke na aminokyseliny. Tie mohli byť využité na produkciu PGA a tiež rast buniek. Biomasa pri použití nehydrolyzovanej srvátky bola dvakrát vyššia v porovnaní s kontrolou.

Tabuľka 14 Výsledky stanovení pre kmeň *B. licheniformis* CCM 2206

	podmienky kultivácie	biomasa (g/l)	polymér kyseliny glutámovej (g/l) gravimetricky	polymér kyseliny glutámovej (g/l) spektrofotometricky
A	10% srvátka	3,120 ± 0,214	5,150 ± 0,311	5,429 ± 0,241
B	10% perie	2,510 ± 0,151	5,550 ± 0,224	5,571 ± 0,187
C	kontrola	1,520 ± 0,201	4,050 ± 0,125	3,783 ± 0,255



Graf 11 Výsledky stanovení pre kmeň *B. licheniformis* CCM 2206

5 ZÁVER

V teoretickej časti tejto bakalárskej práce boli spísané vlastnosti polymérov kyseliny jablčnej a glutámovej, charakteristika ich producentov a potenciálne aplikácie v rôznych odvetviach priemyslu.

V experimentálnej časti bol sledovaný rast bunkovej biomasy a produkcia extracelulárnych polymérov pri odlišných podmienkach kultivácie. Boli využívané jednoduché zdroje dusíka a uhlíka – sacharidy, ale tiež komplexné zdroje týchto prvkov nachádzajúcich sa v odpadových substrátoch (srvátke a hydínovom perí).

Pri produkcii polyméru kyseliny jablčnej boli kultivované dva kmene mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans*, a to *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 a *Aureobasidium pullulans* DSM 3497. V rámci kultivácie tohto mikroorganizmu bol sledovaný vplyv meniacich sa počiatočných koncentrácií glukózy, zdrojov uhlíka a dusíka, ako aj prekursorov na rast buniek a produkciu extracelulárnych polymérov.

Pri aplikácii rôznych koncentrácií glukózy do produkčného média s *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 bola produkcia polyméru kyseliny jablčnej úspešná len pri prídavku uhličitanu vápenatého. Najvyššia koncentrácia hydrolyzovaného polyméru kyseliny jablčnej bola zaznamenaná pri použití 150 g/l glukózy o hodnote 3,4870 g/l. Za optimálnu koncentráciu glukózy pre produkciu polyméru kyseliny jablčnej bola u kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 zvolená 90 g/l, pretože pri ďalších prídavkoch glukózy sa už koncentrácia polyméru kyseliny jablčnej výrazne nemenila. U kmeňa *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 bol polymér kyseliny jablčnej syntetizovaný aj bez použitia uhličitanu vápenatého a najvyššie hodnoty jablčnej kyseliny (2,651 g/l) boli dosiahnuté pri 80 g/l glukózy.

Pri štúdiu efektov rozličných suplementov na produkciu polyméru kyseliny jablčnej kmeňom *Aureobasidium pullulans* DSM 3497 boli lepšie výsledky dosiahnuté po pridaní uhličitanu vápenatého a zámene dusičnanu sodného za dusičnan amónny v produkčnom médiu. Pri tomto experimente boli použité dve inokulá, čo zapríčinilo niekoľkonásobné navýšenie koncentrácie biomasy.

Kultivácia mikroorganizmu uskutočnená s použitím enzymaticky hydrolyzovanej srvátky bola z hľadiska produkcie polyméru kyseliny jablčnej úspešná pri kmeni *Aureobasidium pullulans* CCM 8182, i keď najväčšia koncentrácia jablčnej kyseliny bola nameraná v kontrolnej banke – len pri použití glukózy.

Na biosyntézu polyméru kyseliny glutámovej bol využitý kmeň *Bacillus licheniformis* CCM 2206. Bol sledovaný efekt pH na produkciu tohto polyméru. Na tento účel boli použité rôzne koncentrácie síranu amónneho, ktorý znižoval pH a tiež poskytol zdroj dusíka. Najvyššie koncentrácie polyméru kyseliny glutámovej boli gravimetricky ($3,850 \pm 0,410$ g/l) a spektrofotometricky ($3,371 \pm 0,298$ g/l) namerané pri použití 10 g/l síranu amónneho v produkčnom médiu, táto koncentrácia bola považovaná za optimálnu.

V prípade kultivácie s odpadovými substrátmi – nehydrolyzovanej srvátky a chemicky hydrolyzovaného peria boli pozorované zvýšené koncentrácie biomasy a polyméru kyseliny glutámovej oproti kontrole. Najvyššia koncentrácia polyméru kyseliny glutámovej ($5,571 \pm 0,187$ g/l) bola spektrofotometrickou metódou zmeraná pri prídavku 10 obj. % peria do produkčného média.

- [1] MENSITIERI, Giuseppe, Ernesto DI MAIO, Giovanna BUONOCORE, Irma NEDI, Maria OLIVIERO, Lucia SANSONE a Salvatore IANNACE. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. *Trends in Food Science*. 2011, **22**(2-3), 72-80. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.10.001. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410002190>
- [2] NAIR, Lakshmi a Cato LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(8-9), 762-798. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000664>
- [3] BAJAJ, Ishwar a Rekha SINGHAL. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresour Technology*. 2011, **102**(10), 5551-61. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.047. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241100232X>
- [4] R. C. VAN DER MAAREL, Johan. *INTRODUCTION TO BIOPOLYMER PHYSICS*. Singapore: World Scientific Publishing Company, Incorporated, 2008. ISBN 13 978-981-277-603-7.
- [5] Bioprocessing of agro-residues to value added products. *Bioconversion of waste materials to industrial products: revue littéraire mensuelle*. Second edition. New York: Springer, 1998, pp 197-246. ISBN 9781461558217. ISSN 0014-2751.
- [6] DEVIDAS, Patil, Borase PANDIT a Patil VITTHALRAO. Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*. *The Scientific World Journal*. 2014, **2014**(3), 1-6. DOI: 10.1155/2014/273030. ISSN 2356-6140. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/273030/>
- [7] AKPINAR-BAYIZIT, Arzu, Tulay OZCAN, Lutfiye YILMAZ-ERSAN a Fikri BASOGLU. A Research on Whey as a Renewable Substrate for Single Cell Oil Production by *Saprolegnia diclina*. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2016, **7**(1), 56-61. DOI: 10.7763/IJCEA.2016.V7.542. ISSN 20100221.

Dostupné také z: <http://www.ijcea.org/index.php?m=content>

- [8] TASKIN, M. a E.B. KURBANOGU. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, **111**(4), 826-834. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05103.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05103.x>
- [9] ZHANG, Huili, Jin CAI, Jiaqi DONG, Danping ZHANG, Lei HUANG, Zhinan XU a Peilin CEN. High-level production of poly (β -l-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, **92**(2), 295-303. DOI: 10.1007/s00253-011-3358-4. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3358-4>
- [10] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, , ed. Scientific Opinion on the safety and efficacy of malic acid and a mixture of sodium and calcium malate when used as technological additives for all animal species. *EFSA Journal*. 2014, **12**(2), 356318. DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3563. Dostupné také z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3563>
- [11] YUAN, Ye, Yixin LENG, Hui SHAO, Chunxiang HUANG a Kai SHAN. Solubility of dl-malic acid in water, ethanol and in mixtures of ethanol water. *Fluid Phase Equilibria*. 2014, **377**, 27-32. DOI: 10.1016/j.fluid.2014.06.017. ISSN 03783812. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378381214003616>
- [12] MOON, Soo, Soon HONG, Tae KIM a Sang LEE. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid. *Biochemical Engineering Journal*. 2008, **40**(2), 312-320. DOI: 10.1016/j.bej.2008.01.001. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X08000065>
- [13] CHI, Zhenming, Fang WANG, Zhe CHI, Lixi YUE, Guanglei LIU a Tong ZHANG. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, **82**(5), 793-804. DOI: 10.1007/s00253-009-1882-2. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-1882-2>
- [14] CHI, Zhe, Guang-Lei LIU, Chen-Guang LIU a Zhen-Ming CHI. Poly(β -l-malic acid) (PMLA) from *Aureobasidium* spp. and its current proceedings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(9), 3841-3851. DOI: 10.1007/s00253-016-7404-0. ISSN

0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7404-0>

- [15] KAJIYAMA, Tetsuto, Hisatoshi KOBAYASHI, Kazuko MORISAKU, Tetsushi TAGUCHI, Kazunori KATAOKA a Junzo TANAKA. Determination of end-group structures and by-products of synthesis of poly(α,β -malic acid) by direct polycondensation. *Polymer Degradation and Stability*. 2004, **84**(1), 151-157. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2003.10.005. ISSN 01413910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003003574>
- [16] PORTILLA-ARIAS, José, Rameshwar PATIL, Jinwei HU et al. Nanoconjugate Platforms Development Based in Poly(β ,L-Malic Acid) Methyl Esters for Tumor Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*. 2010, **2010**, 1-8. DOI: 10.1155/2010/825363. ISSN 1687-4110. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2010/825363/>
- [17] LANDÁZURI, Alberto. *Modification of Microbial Polyacids for Drug Delivery Systems*. Barcelona, 2014, 187 s. Dostupné také z: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/95219/TALL1de1.pdf>. Universitat Politècnica de Catalunya. Vedoucí práce Prof. Sebastián Muñoz Guerra, PhD. Montserrat García Álvarez.
- [18] LJUBIMOVA, Julia, Manabu FUJITA, Natalya KHAZENZON, Bong-Seop LEE, Sebastian WACHSMANN-HOGIU, Daniel FARKAS, Keith BLACK a Eggehard HOLLER. Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, **171**(2), 195-203. DOI: 10.1016/j.cbi.2007.01.015. ISSN 00092797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279707000300>
- [19] BUESCHER, Joerg a Argyrios MARGARITIS. Microbial Biosynthesis of Polyglutamic Acid Biopolymer and Applications in the Biopharmaceutical, Biomedical and Food Industries. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, **27**(1), 1-19. DOI: 10.1080/07388550601166458. ISSN 0738-8551. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550601166458>
- [20] TURAN, Başak a Cenk SELÇUKI. Conformational analysis of glutamic acid: a density functional approach using implicit continuum solvent model. *Journal of Molecular Modeling*. 2014, **20**(9), -. DOI: 10.1007/s00894-014-2396-0. ISSN 1610-2940.

Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00894-014-2396-0>

- [21] KULKARNI, Chanda, KS KULKARNI a BR HAMSA. L-Glutamic acid and glutamine: Exciting molecules of clinical interest. *Indian Journal of Pharmacology*. 2005, **37**(3), 148-. DOI: 10.4103/0253-7613.16210. ISSN 0253-7613. Dostupné také z: <http://www.ijp-online.com/text.asp?2005/37/3/148/16210>
- [22] RAJ, Dominic a Maryln LANGFORD. Regulatory responses to an oral D-glutamate load: formation of D-pyrrolidone carboxylic acid in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2001, **280**(2), 214-20. ISSN 0193-1849.
- [23] LUO, Kun, Jingbo YIN, Zhijiang SONG, Lei CUI, Bin CAO a Xuesi CHEN. Biodegradable Interpolyelectrolyte Complexes Based on Methoxy Poly(ethylene glycol)- b -poly(α , l -glutamic acid) and Chitosan. *Biomacromolecules*. 2008, **9**(10), 2653-2661. DOI: 10.1021/bm800767f. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm800767f>
- [24] ASHIUCHI, Makoto, Hisaaki NAKAMURA, Takashi YAMAMOTO, Tohru KAMEI, Kenji SODA, Chung PARK a Moon-Hee SUNG. Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003, **23**(2-6), 249–255. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00087-0. ISSN 13811177.
- [25] BIRRER, Gregory, Anne-Marie CROMWICK a Richard GROSS. γ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994, **16**(5), 265-275. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90032-9. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141813094900329>
- [26] KHALIL, Ibrahim, Victor IRORERE, Iza RADECKA, Alan BURNS, Marek KOWALCZUK, Jessica MASON a Martin KHECHARA. Poly- γ -Glutamic Acid: Biodegradable Polymer for Potential Protection of Beneficial Viruses. *Materials*. 2016, **9**(1), 28-. DOI: 10.3390/ma9010028. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/9/1/28>
- [27] OGUNLEYE, Adetoro, Victor IRORERE, Craig WILLIAMS, David HILL, Aditya BHAT a Iza RADECKA. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*. 2015, **161**(1), 1-17. DOI: 10.1099/mic.0.081448-0. ISSN

1350-0872.

Dostupné

také

z:

<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.081448-0>

- [28] OPPERMANN-SANIO, F. a Alexander STEINBÜCHEL. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *The Science of Nature*. 2002, **89**(1), 11-22. DOI: 10.1007/s00114-001-0280-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-001-0280-0>
- [29] REY, Michael, Preethi RAMAIYA, Beth NELSON et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome biology*. 2004, **5**(10), 77. DOI: 10.1186/gb-2004-5-10-r77. Dostupné také z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- [30] JORGENSEN, James, Michael PFALLER a Karen CARROLL. *Manual of clinical microbiology*. 11th edition. Washington, DC: ASM Press, 2015. ISBN 978-1-55581-738-1.
- [31] CANDELA, Thomas a Agnes FOUET. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*. 2006, **60**(5), 1091–1098. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x>
- [32] LUO, Zhiting, Yuan GUO, Jidong LIU, Hua QIU, Mouming ZHAO, Wei ZOU a Shubo LI. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, **9**(1), -. DOI: 10.1186/s13068-016-0537-7. ISSN 1754-6834. Dostupné také z: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0537-7>
- [33] *CONTROLLED SYNTHESIS OF POLYGLUTAMIC ACID*. 2010. United States. WO2011075483 A1 PCT/US2010/060327. Uděleno 23. 6. 2011. Zapsáno 14. 10. 2010. Dostupné také z: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011075483&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>
- [34] SHIH, I.-, Y.- VAN a M.- SHEN. Biomedical Applications of Chemically and Microbiologically Synthesized Poly(Glutamic Acid) and Poly(Lysine). *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2004, **4**(2), 179-88. DOI: 10.2174/1389557043487420. Dostupné

také z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>

- [35] NEGRULESCU, Anamaria, Viorica PATRULEA, Manuela MINCEA, Cosmin IONASCU, Beatrice VLAD-OROS a Vasile OSTAFE. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012, **23**(12), 2176-2182. DOI: 10.1590/S0103-50532013005000003. ISSN 0103-5053. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [36] YOON, Sung, Jin HWAN DO, Sang YUP LEE a Ho NAM CHANG. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. 2000, **22**(7), 585–588. DOI: 10.1023/A:1005625026623. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005625026623>
- [37] KONGKLOM, Nuttawut, Hongzhen LUO, Zhongping SHI, Chiravoot PECHYEN, Yusuf CHISTI a Sarote SIRISANSANEEYAKUL. Production of poly- γ -glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, **100**(2015), 67-75. DOI: 10.1016/j.bej.2015.04.007. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X15001321>
- [38] ZOU, Xiang, Yipin ZHOU a Shang-Tian YANG. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, **110**(8), 2105-2113. DOI: 10.1002/bit.24876. ISSN 00063592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24876>
- [39] YURLOVA, N.A. a G.S. DE HOOG. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1997, **72**(2), 141-147. DOI: 10.1023/A:1000212003810. ISSN 00036072. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1000212003810>
- [40] MORAES, L. a P. BRITO. The Existing Studies on Biosynthesis of Poly(γ -glutamic acid) by Fermentation. *Food and Public Health*. 2013, **3**(1), 28-36. DOI: 10.5923/j.fph.20130301.04.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ATP	adenozíntrifosfát
CoA	koenzým A
CTAB	cetyltrimetylamónium bromid
ECP	extracelulárne polyméry
IEC	iónovo výmenná chromatografia
MA	kyselina jablčná
PGA	polymér kyseliny glutámovej
PMA	polymér kyseliny jablčnej
ppm	parts per milion, počet častíc na 1 milión ostatných častíc; 1 ppm = 1 mg/l
rpm	revolution per minute, počet otáčok za minútu